UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1964 — N° 480

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE NOUVELLES SUBSTANCES IODÉES INTRATHYROÏDIENNES ET PLASMATIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le mercredi 10 juin 1964

PAR

Angela Mary BRANDRICK

BACHELOR OF SCIENCE (PHARMACY), UNIVERSITÉ DE MANCHESTER

Née à Stoke-on-Trent (Staffordshire, Angleterre), le 24 avril 1940

Examinateurs de la thèse :

MM. F. TAYEAU, professeur . . . . . *Président*

P. BLANQUET, professeur . . . . .

R. MANDOUL, professeur . . . . . *Juges*

G. MEYNIEL, professeur. . . . . (Clermont-Ferrand)

1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549623_0002

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1964 — N° 480

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE NOUVELLES SUBSTANCES IODÉES INTRATHYROÏDIENNES ET PLASMATIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le mercredi 10 juin 1964

PAR

Angela Mary BRANDRICK

BACHELOR OF SCIENCE (PHARMACY), UNIVERSITÉ DE MANCHESTER

Née à Stoke-on-Trent (Staffordshire, Angleterre), le 24 avril 1940

Examinateurs de la thèse :

MM. F. TAYEAU, professeur . . . . . — *Président*

P. BLANQUET, professeur . . . . .

R. MANDOUL, professeur . . . . . — *Juges*

G. MEYNIEL, professeur. . . . . .
(Clermont-Ferrand)

1964

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS.
DOYEN : M. F. TAYEAU. — ASSESSEURS : MM. P. LAUMONIER, G. VITTE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, JOULIA, R. SIGALAS, G. PORTMANN.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
P. FOURMENT	Pharmacologie
E. AUBERTIN	Clinique médicale et des maladies infectieuses
X. J. DUBECQ	Clinique odonto-stomatologique
G. VITTE	Pharmacie chimique et pharmacodynamie
R. FABRE	Physiologie
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales
M. RIVIERE	Clinique d'accouchements
R DE GRAILLY	Clinique médicale
P. DERVILLEE	Médecine légale et médecine du travail
A. FONTAN	Clinique médicale des maladies des enfants
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie
C. PIFFAULT	Physique médicale et pharmaceutique
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée
J. REBOUL	Electroradiologie et clinique d'électricité médicale
L. MASSÉ	Clinique chirurgicale
R. GIRARD	Botanique et cryptogamie
P. MESNARD	Chimie
R. DUFOUR	Anatomie
R. GRANDPIERRE	Physiologie
P. BROUSTET	Clinique médicale
J. MAGENDIE	Clinique chirurgicale
F. TAYEAU	Biochimie médicale A
G. MAYER	Histologie et embryologie
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie
R. SARIC	Pathologie générale et expérimentale
L. POUYANNE	Clinique orthopédique et traumatologie
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et Clinique des maladies de l'appareil digestif
F.-J TRAISSAC	Clinique thérapeutique
R MAHON	Accouchement et obstétricie sociale
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire

MM.	
Mlle G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports
G. MOUSTARDIER	Bactériologie
A. LACHAPELE	Carcinologie
P. CAZAUX	Hydrologie pharmaceutique
E. BESSIERE	Clinique ophtalmologique
H. LEGER	Anatomie pathologique
J. MASQUELIER	Matière médicale
G. MORETTI	Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques
J. DESPONS	Clinique d'oto-rhino-laryngologie
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire
J. LENG-LEVY	Pathologie médicale
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique
E. NEUZIL	Biochimie médicale B
R. STOLL	Biologie
J. LANGE	Clinique urologique
P. FREOUR	Hygiène et Clinique de la tuberculose
F. RIGAUD	Anatomie
J. FAURE	Physio-pathologie et neurophysiologie
G. DUBOURG	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques
J. VILLAR	Clinique gynécologique
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
M. BERGOUIGNAN	Pathologie nerveuse et mentale
N.	Sémiologie médicale
H. CHOUSSAT	Médecine générale
L. CHASTRUSSE	Obstétrique
P. VERGER	Pédiatrie et puériculture
F. LAPORTE	Chirurgie générale
R. TINGAUD	Sémiologie chirurgicale

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. R. GOLSE (Pharmacie - 1re Section),
J. DUHAMEL (Physique médicale), R. CANIVENC (Histologie), J. RIVIÈRE (Médecine générale),
Cl. MARTIN-DUPONT (Médecine générale), J. DAVID-CHAUSSÉ (Médecine générale), J. MARQUEVIELLE (Biochimie médicale).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM.	
H. CABANIE	Anatomie
J. BIRABEN	Anatomie pathologique
H. DULONG DE ROSNAY	Bactériologie
H BRICAUD	Médecine générale
H LAUBIE	Pharmacie (2e Section)
Cl. MASSE	Chirurgie générale
P. du PASQUIER	Bactériologie
R. MARAUD	Histologie et embryologie
J. MEUNIER	Histologie
A. SERISE	Hygiène
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique
J. CANELLAS	Pharmacodynamie
R JENSEN	Chimie biologique

MM.	
J STAEFFEN	Médecine générale
J.-P. DUBECQ	Obstétrique
J. VIDEAU	Anatomie
G. NEVERRE	Physiologie
J. BROUSSIN	Electroradiologie
A. CASTAING	Médecine générale et thérapeutique
R. TESSIER	Pneumo Phtisiologie
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale
J. BAILENGER	Parasitologie
C. LAGARDE	Carcinologie
C. BERAUD	Therapeutique
R LELOURD	Pneumo-phtisiologie
J. BENTEGEAT	Immunologie, sérologie, hématologie
M. BLANC	Neuropsychiatrie
L. COURAUD	Chirurgie générale

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
J. DEPAULIS	Chirurgie générale
P. BENOIT	Odonto-stomatologie
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale
L. CORCELLE	Ophtalmologie
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie
P. BLANCHOT	Médecine générale
L. DOUTRE	Chirurgie générale
G. DELORME	Electroradiologie
F. BALLANGER	Urologie
P. BIRBIS	Chirurgie générale

MM.	
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie
H. POUYANNE	Neuro-chirurgie
P. LOISEAU	Neurologie et psychiatrie
R. GENESTE	Orthopédie
G. CABANIEU	Médecine générale
F. FONTAN	Chirurgie générale
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique
J. LASSERRE	Orthopédie

AGRÉGÉS LIBRES :

G. FAUGERE — Obstétrique
M. L'EPEE — Médecine légale

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :

J. MOUNIER — Physique pharmaceutique

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM	
G. FAUGERE	Accouchements
F. PERY	Puériculture
J. COUSTOU	Législation pharmaceutique
G. TEMPERE	Organographie et physiologie végétale
J MARQUEVIELLE	Chimie biologique analytique
R. BABIN	Chimie générale et minéralogie
Mme LINQUETTE	Physiologie
J. ROZIER	
R. BAUTE	Phytopharmacie
J.-M. AUBY	Médecine internationale
P. L'EPEE	Médecine légale
J. de LOSTALOT	Pharmacologie
Cl. BÉRAUD	
J DUHAMEL	Statistique appliquée à la biologie
H. PARLANGE	Optique
Mlle LARCEBAU	Hygiène pharmaceutique
Mlle LIERMAIN	Bromatologie
BANNEL	Psychiatrie médico-légale
G. CABANIEU	Allergologie

MM.	
L. TEXIER	Vénéréologie
R TINGAUD	Pathologie chirurgicale
J. DEPAULIS	
MARZAT	Contrôle physico-chimique des médicaments
P. BERNADAC	Application médicale des radio-isotopes
J. BAILENGER	Zoologie
M. REGNER	Pharmacie industrielle
Mlle COUXI	
M. LABADIE	Biochimie médicale
D.REISS	Chimie biologique
V.DARGELOS	Parasitologie et biologie appliquée
J.-Cl. ROQUES	Physique médicale
P. BONJEAN	Anatomie
M. SENTENAC	Puériculture
Cl. MARTIN	
E. JOUZIER	Chimie bio-analytique
R. MUR	Législation médico-sociale du travail agricole
M. GOT	Séméiologie neuro-chirurgicale
J. DANGOUMAU	Pharmacologie

Le Conseiller administratif, Secrétaire de la Faculté : André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

Nous dédions ce travail à la COMMISSION Pharmaceutique Franco-Britannique dont l'heureuse initiative permet des échanges entre Pharmaciens des deux pays.

Nous remercions M. le Professeur GUILLOT, M. le Docteur CLEMENT, ainsi que les Membres du Comité qui ont facilité notre venue en France.

A Sir Hugh LINSTEAD, nous sommes particulièrement reconnaissante des multiples interventions qui ont contribué à la réalisation de cet échange et, de l'amabilité qu'il n'a cessé de nous témoigner.

Nous n'oublions pas que c'est grâce à l'aide efficace de la Bristish Pharmaceutical Society et du Conseil de l'Ordre des Pharmaciens que nous avons pu résider pendant deux années en France.

- - - - - - - - - - -

Nous dédions ce travail à la COMMISSION Pharmaceutique Franco-Britannique dont l'heureuse initiative permet des échanges entre Pharmaciens des deux pays.

Nous remercions M. le Professeur GUILLOT, M. le Docteur CLEMENT, ainsi que les Membres du Comité qui ont facilité notre venue en France.

A Sir Hugh LINSTEAD, nous sommes particulièrement reconnaissante des multiples interventions qui ont contribué à la réalisation de cet échange et, de l'amabilité qu'il n'a cessé de nous témoigner.

Nous n'oublions pas que c'est grâce à l'aide efficace de la Bristish Pharmaceutical Society et du Conseil de l'Ordre des Pharmaciens que nous avons pu résider pendant deux années en France.

- - - - - - - - - - -

Nous sommes heureuse de nous souvenir que c'est M. le Professeur K. BULLOCK qui nous a donné le goût de la recherche scientifique.

A Monsieur VRIGNAUD et à Madame CROIZET, Assistants du Laboratoire de M. le Professeur BLANQUET, nous disons nos bien vifs remerciements pour leur collaboration amicale et leur précieuse contribution à la réalisation de ce travail.

A tous ceux du Laboratoire, qui nous ont si aimablement accueillie et ont facilité notre adaption aux coutumes françaises, nous exprimons nos sentiments bien amicaux. Qu'ils trouvent ici, l'assurance de notre très fidèle souvenir.

- - - - - - - - - - - -

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur G. MEYNIEL

Professeur de Physique Médicale

Chevalier des Palmes Académiques

Croix de Guerre de TOE

Directeur du Centre de Lutte

contre le Cancer de CLERMONT-FERRAND

Nous sommes reconnaissante d'avoir bien voulu accepter de siéger dans le Jury de notre Thèse.

Monsieur le Professeur MANDOUL

Professeur de Zoologie et Parasitologie

Professeur Honoraire de l'Ecole Nationale de Medecine et de Pharmacie de LIMOGES

Officier des Palmes Académiques

Officier du Mérite Sportif

Qui a bien voulu faciliter une partie de notre travail, nous adressons nos vifs remerciements.

Monsieur le Professeur P. BLANQUET

Professeur de Physique Nucléaire Appliquée
et de Radiobiologie

Officier des Palmes Académiques

Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine

Docteur ès Sciences

Visiting Professor de l'Université de Californie
(BERKELEY, U.S.A.)

Nous sommes profondément reconnaissante pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé dans son Laboratoire.

Il nous a initiée aux délicats problèmes du Métabolisme Thyroïdien, aux techniques des radio-isotopes et à leur utilisation dans les recherches biologiques. Grâce à son inlassable enthousiasme, à ses précieuses directives, nous avons pu réaliser ce travail.

Qu'il trouve ici, l'expression de notre vive gratitude, et nos remerciements pour tous les enseignements qu'il nous a si généreusement dispensés.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur TAYEAU

Doyen de la Faculté de Medecine et de Pharmacie

Membre Correspondant de l'Académie de Médecine

Professeur de Biochimie Médicale

Docteur ès Sciences

Chevalier de la Légion d'Honneur

Commandant des Palmes Académiques

Chevalier du Mérite Agricole

Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine

Titulaire (2° degré) de la Décoration Danesche (IRAN)

Officier de l'ordre National Sénégalais

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre Jury, nous adressons nos remerciements respectueux.

Nous lui savons gré d'avoir faciliter notre séjour à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux, et d'avoir permis la soutenance de cette Thèse.

A B R E V I A T I O N S

I	: Iodure.
MIT	: 3 mono iodotyrosine.
DIT	: 35 di - iodotyrosine.
T_3	: 35 3' triiodothyronine.
T_4	: 35 3'5' tétra iodothyronine - thyroxine.
TT	: Tyrosyl-tyrosine.
TT 1I	: Tyrosyl- tyrosine mono iodée.
TT 2I	: Tyrosyl - tyrosine di iodée.
TT 3I	: Tyrosyl - tyrosine tri iodée.
TT 4I	: Tyrosyl - tyrosine tétra iodée.
TSH	: Thyroïd Stimulating Hormone.
CRF	: Corticoreleasing factor.
TRF	: Thyrotropin releasing factor.
TCA	: Acide Trichloracétique.
TETRAC	: Acide Tetra iodothyroacétique.
TRIAC	: Acide Tri iodothyro acétique.
PBI	: Protein Bound Iodine.
BEI	: Butanol Extractible iodine.
PTU	: Propyl Thiouracile.
TBG	: Thyroxin Binding Globuline.
TBA	: Thyroxin Binding Albumine.
TBPA	: Thyroxin Binding Préalbumine.

I N T R O D U C T I O N

Les études concernant la glande thyroïde ont fait l'objet de nombreux progrès depuis l'apparition des isotopes radioactifs.

Faisant suite à la synthèse de la thyroxine (1927) par HARINGTON (13), les traceurs iodés ont permis d'avoir une idée d'ensemble sur la dynamique du métabolisme thyroïdien. Cependant, malgré les nombreuses précisions qu'ils ont fournies, nombre de points obscurs subsistent encore concernant souvent des problèmes fondamentaux, comme par exemple, la biosynthèse de l'hormone, son mode d'action au niveau des tissus et le contrôle central de la glande thyroïde.

En particulier, en ce qui concerne la biosynthèse de l'hormone, des données contradictoires se sont fait jour à tel point que M. le Professeur LISSITZKY pouvait écrire (62) :

Le mécanisme de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes est encore presque inconnu malgré de très nombreux travaux dont le nombre augmente sans cesse".

Et M. le Professeur ROCHE ajoutait (63) :

"Le mécanisme de la synthèse des hormones n'est totalement défini dans aucune de ses phases qu'il s'agisse de la concentration des iodures plasmatiques, de l'halogénation, de la tyrosine ou de la condensation des iodotyrosines. Dans chacun de ces domaines, les chercheurs partants d'hypothèses considérées il y a 10 ans comme très plausibles, découvrent une complexité de plus en plus grande, au fur et à mesure que progressent leurs travaux... Aussi la conviction que nos connaissances ne constituent qu'une base de départ sur la plupart des points essentiels de la biochimie thyroïdienne, tend-elle à s'imposer.

L'objet de ce travail est en accord avec ces conclusions et, ayant constaté comme ces auteurs, de nombreuses discordances dans les conceptions admises jusqu'ici, nous avons essentiellement cherché à déterminer

s'il n'existait pas dans le plasma, en particulier, d'autres substances iodées que celles qui y étaient habituellement rencontrées et dont la présence pouvait éventuellement fournir des explications partielles aux contradictions constatées.

Ceci nécessitait également de considérer avec attention, les mécanismes de régulation et de contrôle du métabolisme thyroïdien dans leur aspect moderne.

Ce travail ne constitue ni un essai d'explication, ni une interprétation quelconque, il est pour la plupart, expérimental et c'est simplement dans le dernier chapitre que nous avons émis quelques hypothèse. Son seul but est de favoriser des recherches ultérieures fécondes.

CHAPITRE 1

DONNEES GENERALES SUR LE METABOLISME THYROIDIEN

Après les romarques de Roger de SALERNE (1170) démontrant le rôle de l'iode dans le métabolisme thyroïdien, il fallut attendre la fin du siècle dernier (1882) pour que les frères REVILRDIN et KOCHER mettent en évidence l'importance de la thyroïde en tant que glande endocrine, l'ablation complète de cet organe, à la suite de goitres, produisant un myxoedème grave. Les recherches chimiques portant sur la thyroïde ne tardèrent pas à se faire jour et en 1895 BAUMANN (1-2) montra l'existence, dans les hydrolysats thyroïdiens d'une substance organique iodée, de nature protéique extractible par le chlorure de sodium (3). Quelques années plus tard OSWALD (4) prouva que l'action pharmacodynamique des extraits thyroïdiens était due à la thyroglobuline. Mais la proportion d'iode y est si faible que ce n'est qu'en 1915 que KENDALL (5-6-7) isola une substance active : la L-thyroxine.

Parallèlement, MARINE & ROGOFF (8) montraient que l'iode minéral introduit dans l'organisme se concentrait electivement dans la thyroïde (9-10-11-12). En 1925, HARINGTON (13) identifia la L-thyroxine à l'acide L-35-diiodo 4(3'-5') diiodo-4'-hydroxyphénoxy phenyl α aminopropionique. Une fois la formule élucidée, l'étape suivante fut franchie rapidement, puisque en 1927, HARINGTON & BARGER (14) réussissaient à effectuer sa synthèse, puis successivement isolaient, identifiaient et synthétisaient la L-35-diiodotyrosine (15-16)

Ces auteurs, à la suite des travaux sur l'ioduration artificielle des protéines (17-18) furent amenés à supposer que la thyroxine se formait au sein de la thyroglobuline par couplage et condensation de deux molécules de diiodotyrosine. LUDWIG & Van MUTZENBERGER apportèrent ap-

paremment une première confirmation expérimentale, en extrayant des hydrolysats de caséine iodée de la T4, de la MIT et de la DIT (19-20).

Des points fondamentaux avaient été établis : on connaissait le rôle prépondérant de l'iode, on savait que ce métalloide s'incorporait dans la thyroïde même à une protéine spécifique, on avait enfin isolé et synthétisé une substance d'activité hormonale indéniable : la thyroxine.

Ces recherches fondamentales avaient conduit à des applications médicales importantes : traitement des déficiences thyroïdiennes au moyen d'extraits plus ou moins purifiés de glande thyroïde, et aux premières utilisations de la T4 et de la DIT en tant qu'agents de traitement, dans divers disfonctionnements thyroïdiens.

Ces conclusions ne subirent pas de modifications jusqu'à la découverte de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric JOLIOT-CURIE (1934) (21). En effet, les JOLIOT-CURIE avaient montré que l'on pouvait obtenir pour la plupart des éléments figurant au tableau de MENDELEJEFF, des isotopes radioactifs. En conséquence, on pouvait envisager l'étude cinétique de tous les éléments au moyen de leur radioactivité.

Les radioéléments artificiels vont dès lors, permettre de préciser les différentes étapes du métabolisme thyroïdien et d'aborder une étude quantitative souvent inaccessible aux microtechniques de la chimie biologique classique. La plupart des analystes modernes de la physiologie et de la biochimie thyroïdiennes utiliseront désormais cinq des onze isotopes de l'iode 127. (Tableau 1)

En effet, on peut obtenir plusieurs isotopes de l'iode, c'est-à-dire plusieurs éléments qui possèdent comme lui 53 protons dans leur noyau mais qui en diffèrent par le nombre de neutrons. Ces éléments radioactifs se désintègrent avec une période variable en émettant un signal facilement détectable sous forme de radiations $\beta\gamma$.

De 1938 à 1942, l'iode 128 (émetteur $\beta\gamma$) de période 28 minutes

	PERIODE	ENERGIE des RADIATIONS en MEV	
		β	γ
I^{125}	60 jours		0,035
I^{128}	24,99 mn	2,02 (95%)	0,428 (7%)
I^{130}	12,6 h	1,03 (60%) 0,61 (40%)	0,744 0,667 0,537 0,417
I^{131}	8,141 j	0,608 (87,2%) 0,335 (9,3%)	0,364 (80%) 0,637 (9%)
I^{132}	2,4 h	2,2	0,69

TABLEAU I

Isotopes de I_{127} utilisés en biologie

et l'iode 130 (émetteur β γ) de période 12 heures 6, ont permis à HERTZ (22) HAMILTON (23) JOLIOT (24-24) LEBLOND (10) et à MANN (26) d'ouvrir la voie aux recherches radiochimiques relatives à la thyroïde. Les premiers travaux furent faits en utilisant la seule technique des radioisotopes sans association (Carrier Free). C'est ainsi que par simple administration d'iode radioactif à un animal dans son régime, on put montrer en mesurant la radioactivité thyroïdienne, soit in vivo, soit après le sacrifice, que l'iode se concentrait d'une manière très appréciable dans le tissu thyroïdien dans les minutes qui suivaient son administration. Cette concentration était très importante au bout de 24 heures puisqu'elle pouvait atteindre 20 à 25 % de la dose administrée chez le rat et 40 à 50 % chez l'homme.

Mais la brièveté de la période de ces éléments, iode 128, iode 130 limitait leur emploi en biologie et les travaux plus récents furent conduits en majorité avec l'iode 131 (émetteur β,γ) de période 8 jours. Cet isotope radioactif, obtenu d'abord par réaction (n, γ) à partir du tellure puis comme produit de fission dans les piles, a des propriétés chimiques identiques à celle de l'iode 127. La différence de masse entre les deux isotopes est négligeable et l'utilisation de l'iode 131 est facilitée par sa période assez longue pour une expérimentation convenable, mais cependant assez brève, pour que sa radioactivité ne devienne pas, à dose traceur, nocive pour l'organisme. L'énergie élevée des particules β émises le rend facilement détectable par les techniques habituelles et la faible fraction de rayonnement γ est mise à profit, en clinique, dans l'exploration fonctionnelle de la glande thyroïde.

Les possibilités données par les radioisotopes d'utiliser des quantités physiologiquement négligeables (doses traceuses) de l'élément dont on se propose d'étudier le métabolisme, a permis à LEIN (27-28) LEBLOND (29) de préciser que seulement 1 mg d'iodure provoque, chez le rat, la "saturation" de la glande thyroïde.

Si l'iode radioactif, seul, facilite déjà une étude plus rationnelle du métabolisme thyroïdien, son utilisation combinée, aux méthodes physicochimiques modernes s'est montrée particulièrement féconde.

L'autoradiographie donna aux morphologistes la possibilité de préciser les diverses localisations de l'iode au cours de son métabolisme (30-31-32-33). Mais parmi les nombreuses techniques proposées, la chromatographie sur papier fut la première utilisée.

En 1947, FINK (34) et coll.l'appliquèrent à l'étude d'un hydrolysat thyroïdien. Ces auteurs ont ainsi révélé la présence d'iodures, de L-thyroxine, de DIT et d'un composé inconnu bientôt identifié à la MIT (35-36).

Des chromatographies nombreuses furent alors effectuées dans différents solvants, ascendantes ou descendantes, en phase acide ou alcaline, chaque groupe de chercheurs manifestant une préférence pour un solvant plutôt qu'un autre. Ces nombreux travaux furent fructueux puisqu'il conduisirent à la découverte d'une nouvelle substance douée d'activité hormonale considérable la 353' triiodo-thyronine : T3 isolée simultanément à Paris par ROCHE et coll. (37) et à Londres par GROSS & PITT-RIVERS (38) en 1952. Ces deux groupes de chercheurs expérimentant avec des solvants différents montrèrent que la T3 était un constituant de la thyroglobuline (39-40) et que sa radioactivité correspondait à environ 5 % de la radioactivité totale de la thyroïde. En outre, ROCHE montrait qu'il existait aussi un peu de diiothyronine: T_2 (40) d'activité hormonale très faible.

Cette découverte marquait un tournant des recherches concernant le métabolisme thyroïdien, car elle montrait qu'il existait au moins deux hormones thyroïdiennes = T_4 et T_3.

La chromatographie sur papier allait encore permettre de montrer qu'il existait d'autres hormones thyroïdiennes, et ce fut le mérite de ROCHE et coll. de prouver que la 33'5 T_3 c'est-à-dire l'isomère de la précédente et la 33' T_2 se rencontraient également dans la thyroïde

et qu'elles étaient, elles aussi douées d'activité hormonale.(41)

Les études sur le métabolisme thyroïdien se développèrent dès cette époque de façon considérable.

Le rôle du foie en particulier fit l'objet de nombreuses investigations. On savait déjà que la thyroxine s'y trouvait en forte concentration (KRAYER) (1928).(42), GROSS & LEBLOND (43) montraient que deux heures après l'injection de T_4 marquée chez le rat, on trouvait de 10 à 25 % de T_4 dans le foie.

On savait aussi, depuis 1919 (44), qu'il existait une excrétion biliaire de T_4 et celle-ci était confirmée de façon absolue par GROSS & LEBLOND. (43) C'est alors que TAUROG et coll. (45-46-47) donnèrent d'importantes précisions sur le devenir de T_4 dans les voies biliaires. En injectant T_4-131 I à des rats, ils virent apparaître rapidement un composé radioactif dans la bile. La chromatographie montra qu'il s'agissait d'une substance iodée, différente de T_4 rencontrée dans le sang. Ils lui donnèrent le nom de composé U. L'hydrolyse par la glycuronidase entrainait la disparition de la tache du composé U et l'apparition d'une tache au Rf de T_4. Du point de vue métabolique, ce glycuronoconjugué de T_4 est hydrolysé lors de son passage à travers la barrière intestinale et environ 75 % de T_4 injectée sont alors éliminés dans le fécès et le reste par l'urine, sous forme d'iode inorganique.

A la même époque, ROCHE et coll. (48) parvenaient à des conclusions identiques. Ils montraient en outre qu'après ligature des voies biliaires chez le rat, les glycuronoconjugués passaient dans la circulation générale. (48-49)

D'ailleurs, le rôle du foie devait encore faire l'objet d'intéressantes recherches chez l'homme, VANNOTI (50), ses observations cliniques confirmèrent que le foie normal excrétait la T_4 et son glycuronoconjugué dans la bile. Dans le cas d'obstruction des voies biliaires, le glycuronoconjugué passait avec la bile dans le sang, tandis que,

dans les affectations diffuses du foie, la cellule hépatique n'était plus capable de conjuguer T_4 avec l'acide glycuronique. Le foie était également capable de désioder une partie de T_3 et de T_4. En effet, si l'on examine l'élimination urinaire d'un animal hépatectomisé ayant reçu T_3 et T_4 marquées, on constate que la conversion en iode inorganique ne se fait que très partiellement et que l'animal au contraire élimine en grande quantité le conjugué de T_4 et un composé issu du métabolisme de T_3 (51).

Un problème capital fut enfin posé par l'utilisation périphérique des hormones au niveau des effecteurs. Dans ce cas, encore, la chromatographie sur papier et 131 I firent réaliser d'importants progrès. On sait en effet, que l'action de T_4 ne s'exerce qu'après un délai de plusieurs heures. C'est pourquoi, il était logique de penser que les hormones thyroïdiennes étaient inactives sous leur forme circulante et qu'elles se transformaient en une forme active pour influencer les effecteurs. Après de nombreux essais infructueux, on put penser avoir mis en évidence ces formes actives lorsque THIBAULT (52) publia un mémoire concernant l'action des dérivés acétiques des hormones thyroïdiennes (TETRAC et TRIAC) dont PITT RIVERS & HARINGTON (53-54) avaient réalisé la synthèse. La mise en évidence par ROCHE (55-56) de ces dérivés thyroacétiques dans le foie et le rein semblait apporter une confirmation aux recherches de THIBAULT. Malheureusement les résultats concernant l'absence de période de latence sur la consommation d'oxygène furent infirmés (57-58-59)

Par ailleurs, nous avons déjà signalé la conjugaison assurée essentiellement par le foie, accessoirement par le rein qui conduit à la formation de glycurono (60) et de sulfoconjugués (61)

Ces deux processus ne donnent pas de précision bien grande sur le devenir des hormones thyroïdiennes au niveau des tissus et sur leur mécanisme d'action cellulaire.

Des travaux récents concernant un troisième processus, celui de

la désiodation, semblent au contraire montrer qu'une étude approfondie de ces phénomènes paraît susceptible de conduire à une connaissance précise du mode d'action périphérique de ces hormones. LISSITZKY et coll. (64-65-66) se sont livrés à des études expérimentales très complètes sur ce problème délicat. Ils rapportent le phénomène de désiodation à l'existence dans les tissus d'un enzyme spécifique : la thyroxine-désiodase et l'effet inhibiteur à certaines protéines intracellulaires capables de fixer les hormones, les protégeant ainsi de la désiodation. La thyroxine-désiodase est spécifique et réalise des désiodations différentes de celles effectuées par d'autres systèmes enzymatiques.

La thyroxine-désiodase ne semble catalyser la désiodation des hormones thyroïdiennes que lorsque celles-ci sont libres, mais les hormones sont protégées par leur union avec certaines protéines. Dans le cas du plasma, on sait que T_4 et à un moindre degré, T_3 sont capables de s'associer à l'inter α 1 α 2 globuline , ainsi qu'à la préalbumine (67). Dans les cellules, la démonstration de la présence de protéines s'associant en particulier à T_4 (Thyroxine binding protein) a été effectuée récemment (68).

En conclusion, grâce à la chromatographie sur papier et à l'iode 131, on peut résumer nos connaissances sur la génèse et le métabolisme des hormones thyroïdiennes de la façon suivante.

1° l'iode exogène ou circulant pénètre dans la thyroïde, y est transformé en thyroglobuline. Celle-ci par clivage enzymatique donne naissance à 2 hormones principales T_4 et T_3 qui sont libérées dans le sang.

2° Les hormones circulantes peuvent être l'objet de différentes voies métaboliques.

a) déshalogénation totale au niveau des tissus et par conséquent au stade d'utilisation grâce à la thyroxine-désiodase.

b) désiodation partielle de T_4 conduisant à T_3 et T_2 mais ce

processus est extrêmement discuté.

c) formation de glycurono ou sulfoconjugués.

d) désamination oxydative conduisant aux acides thyropyruviques puis thyroacétiques.

Mais il est cependant nécessaire de faire la critique des méthodes utilisées et de voir les différents reproches que l'on peut leur adresser.

En ce qui concerne la technique elle-même des radioisotopes, on sait que ces éléments suivent exactement le même sort que l'élément naturel. Cependant peut-être, faudrait-il tenir compte des échanges possibles I 127, I 131, dans les différents composés. Ces réactions d'échanges se produisent à une échelle réduite, mais il faut nécessairement admettre qu'elles s'effectuent avec le même rendement pour tous les composés examinés, ce qui est difficilement vérifiable.

Ce n'est là qu'une objection mineure et la technique des radioisotopes a amplement fait ses preuves pour qu'on ne s'attarde pas à ce problème.

Par contre, il nous semble que la technique de chromatographie doive être examinée avec un oeil plus critique. Tout d'abord, la question des solvants est préoccupante et en particulier celle du temps de contact entre le mélange à analyser et le solvant chromatographique. Car il ne faut perdre de vue que l'on a affaire à des substances dont la désiodation est particulièrement facile, mais la désiodation n'est pas le seul phénomène à intervenir et il semble exister en particulier avec les acides aminés thyroïdiens des artefacts importants dont l'origine reste obscure et qui surviennent notamment lorsqu'on fait de la chromatographie bidimensionnelle. LISSITZKY (69) cite l'exemple d'une préparation de T_3 pure chromatographiée en pentanol-ammoniaque 2N, puis en butanol-ammoniaque 2N. Son cliché au lieu de montrer une seule tache correspondant à T_3 révèle l'existence de T_4, TRIAC, TETRAC, T_2, iodure et de 2 spots inconnus.

C'est pourquoi, il nous semble logique lorsqu. on opère avec des substances aussi labiles que les acides aminés iodés, de ne pas trop prolonger l'opération, de ne pas utilisor de radioactivité trop grande et de s'abstenir chaque fois que cela est possible de faire des chromatographies à deux dimensions. La mise en place de témoins internes sur chaque chromatogramme est évidemment de rigueur.

Ces considérations ont amené à penser qu'il était nécessaire maintenant que la biochimie thyroïdienne avait dépassé son stade analytique de disposer de méthodes aussi quantitatives que possible pour l'étude des hydrolysats thyroïdiens et des hormones circulantes.

Nous rapporterons donc brièvement maintenant les méthodes qui font appel à la chromatographie sur colonne, soit sur alumine ou kieselghür, soit sur résine échangeuse d'ions.

En 1951, ROSENBERG (70) publia une technique de séparation des acides aminés iodés sur cellulose, puis GROLKVIST & HELLBERG (71) d'une part, GROSS & PITT-RIVERS (72) d'autre part, suggérèrent l'emploi de colonnes de kielselghür, enfin, en 1953, DOBYNS & BARRY (73) utilisèrent l'amidon.

La méthode au kielselghür a fait l'objet d'heureuses modifications de la part de BRANSCH (74). Nous n'entrerons pas dans le détail de la préparation du kielselghür qui bien que délicate, est beaucoup plus facile à réaliser que celle de l'amidon (DOBYNS & BARRY). L'élution de T_4, T_3, I est faite au moyen d'un mélange de chloroforme à 20 % et de n-butanol volume à volume saturé avec NaOH 0,5 N. Après élution de ces 3 substances, le solvant est remplacé par un mélange n-butanol, n-propanol NaOH 0,05 N (9/1/1). Dans ces conditions, la colonne cède MIT et DIT, parfaitement séparées. L'étalonnage est effectué au moyen de substances pures radioactives ou non et le rendement de la méthode est ainsi déterminé. Il est de l'ordre de 90 à 98 % pour chacun des acides aminés iodés.

Pour DOBYNS & BARRY, les colonnes d'amidon subissent une préparation minutieuses selon la technique de STEIN & MOORE (75). L'éluant utilisé est le système butanol-propanol-eau (1/2/IV) et l'identification des pics est également exécutée à partir de solutions pures d'acides aminés. Cette méthode a été ensuite étendue à l'étude des hydrolysats thyroïdiens. L'emploi de l'éluant propanol-butanol-HCL fournit une séparation partielle des acides aminés thyroïdiens, mais ne permet pas cependant d'effectuer la séparation MIT-DIT. L'utilisation d'un éluant alcalin butanol-propanol-CO_3 NA_2 0,05 (1/2/IV) permet par contre de l'effectuer. Dans ces conditions, la MIT est éluée et la DIT reste sur la colonne. La combinaison des 2 éluants acide et alcalin, permet de résoudre le problème : l'élution est commencée en phase alcaline (la colonne cède successivement T_4, I, MIT) poursuivie ensuite en phase acide pour libérer la DIT. La séparation ainsi obtenue est de très bonne qualité.

Ces deux techniques sont excellentes, les seules critiques que l'on puisse leur adresser sont la préparation de la colonne (opération délicate dans le cas de l'amidon) et le fait que l'iodure participe à l'élution.

Aussi BLANQUET et coll. (76-77-78-79-80) à la suite de remarques de SCOTT & REILLY (81) ont pensé qu'il serait possible d'utiliser les ressources importantes des résines échangeuses d'ions. Ils mirent au point une méthode sensiblement plus simple et plus rapide qui surtout présente l'avantage d'effectuer une exclusion absolue de l'I^-, dès le début de l'opération.

D'autre part, la facilité de préparation des colonnes est grande et ne nécessite pas de nombreuses opérations comme dans le cas de l'amidon. Il est enfin un autre impératif auquel ont répondu ces auteurs. Celui de ne pas utiliser de trop nombreux éluants et si possible d'utiliser un éluat "universel". Voici un résumé de la technique

mise au point. La résine DOWEX 1X2 200-400 meshs est placée sous sa forme OH par traitement à l'NH_4OH 2N, suivi d'un lavage prolongé. L'élution est assurée par l'HCL 0,2N + 3,75 % de n-butanol. De cette façon on voit apparaître une série de pics radioactifs qui correspondent à la MIT, DIT, T_4 et un pic composite sur la nature duquel nous reviendrons plus loin. L'analyse complète d'un hydrolysat thyroïdien nécessite dans ces conditions 3 heures au maximum, compte-tenu du fractionnement et du comptage. Malheureusement cette technique, si elle présentait de nombreux avantages et si elle était quantitative du point de vue DIT et MIT, manifestait un rendement déficitaire pour les thyronines.

GILTON & PITT RIVERS (82) proposèrent alors, quelques années plus tard, une modification très valable de la technique BLANQUET-MEYNIEL, en opérant avec des gradients d'acide acétique de pH décroissant. On obtenait ainsi les mêmes bandes, mais le caractères quantitatif était mieux conservé pour les thyronines. Passait en tête d'élution, un pic composite que GILTON & PITT RIVERS identifiaient à la thyroglobuline.

Les méthodes pré-citées ont permis de se faire une idée exacte du métabolisme intra-thyroïdien, puisq'elles apportaient les possibilités de doser chacun des acides aminés présents dans la glande.

Mais dès 1953-54, il a été tenté de mettre au point des méthodes précises de détermination des composés iodés présents dans le plasma. Car, s'il est intéressant de connaître ce qui se passe dans la thyroïde, il l'est encore plus de savoir comment circulent les hormones dans le plasma et à quelle concentration, puisque c'est le plasma qui conduit en définitive ces hormones à leur lieu d'utilisation.

Pour résoudre ce type de problème, les tendances ont été très diverses, et les premières acquisitions notamment, furent faites par les méthodes conventionnelles. C'est ainsi que TAUROG et coll. (83) purent montrer que la substance circulant dans le sang présentait les mêmes caractéristiques chromatographiques que la T_4. C'est aussi par chromato-

graphie sur papier que ROCHE et coll. (84) montrèrent que la T_3 circulait dans le plasma, (à peu près au même moment que GROSS) (85). Enfin, par électrophorèse, GROSS et coll. purent prouver que la thyroxine migrait associée à une protéine (TBG). Ensuite, on constata que ces hormones pouvaient être associées à d'autres protéines (TBA, TBPA). En outre MICHEL et coll. (41) mettaient en évidence dans le plasma la $33'T_2$, ainsi que les isomères de la T_3.

Les critiques que l'on peut adresser à ce type d'expériences résultent du fait que, au niveau du plasma, les radioactivités sont toujours basses et que par conséquent, étant donné les faibles quantités de substance que l'on peut soumettre à une électrophorèse ou une chromatographie, c'est-à-dire étant donné les très faibles capacités de ces systèmes, on est toujours limité par la sensibilité du comptage, et on peut dire que toutes ces expériences ont été faites en utilisant les indicateurs nucléaires à doses non physiologiques.

Deux possibilités étaient donc offertes, ou augmenter la sensibilité du comptage, ou disposer d'un système de meilleure capacité. Ces deux possibilités ont été exploitées simultanément puisque depuis 1953 environ, sont apparus les scintillateurs plastiques et les photomultiplicateurs et que d'autre part, il a été possible d'adapter la méthode des résines échangeuses d'ions au dosage plasmatique.

En ce qui concerne la capacité de ces systèmes, on peut soumettre facilement 2 millilitres de plasma à une résine et l'on obtient donc un gain de 1 000 par rapport à 2 microlitres de la chromatographie ou de l'électrophorèse. Par ailleurs, on sait, que le rendement d'un puits est au moins cinquante fois supérieur à celui des premiers systèmes de comptage (pour le γ).

Nous résumerons brièvement ci-dessous les méthodes proposées en 1960 par BLANQUET & MEYNIEL (86), utilisant les résines échangeuses d'ions, dont nous nous sommes habituellement servis.

La méthode de SCOTT & REILLY (81) consistait à fixer sur une résine appropriée les iodures radioactifs du plasma. Partant de cette idée, la méthode de BLANQUET -MEYNIEL (86) est basée sur l'utilisation conjuguée de résines anioniques et cationiques permettant de séparer trois fractions iodées dans le plasma. (Schéma 1)

Deux microcolonnes de petit diamètre sont placées l'une au-dessous de l'autre, la supérieure contient la résine cationique DOWEX 50X2 sous sa forme H^+, l'inférieure, la résine anionique DOWEX 1X2 sous sa forme CL^-.

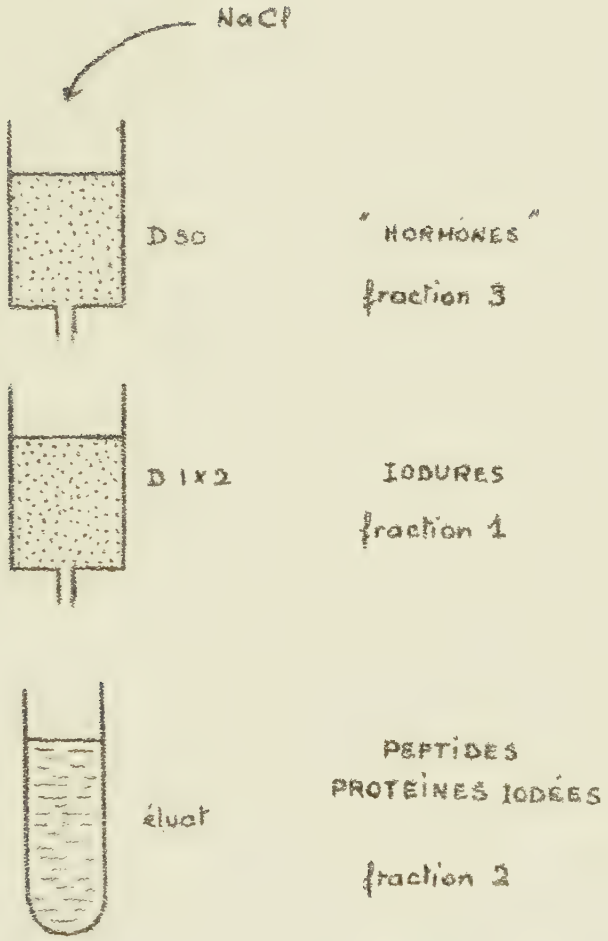
Lorsque les 2 ml de plasma ont pénétré la colonne supérieure, on effectue simplement une élution des deux colonnes au moyen de NaCL 9 ‰ ou simplement d'eau distillée.

Les thyronines restent bloquées sur la résine cationique (DOWEX 50) alors qu'une fraction protéine + peptide iodés s'écoule à la base du système où on la recueille, les iodures étant bien entendu échangés de manière absolue sur la deuxième colonne (DOWEX 1X2).

La détermination quantitative est particulièrement facile puisqu'il suffit de placer chacune des microcolonnes dans le puits d'un compteur à scintillation, et de mesurer également la radioactivité de l'éluat.

Nous préciserons toutefois que vu l'échange ou la fixation des substances iodées à la partie toute supérieure de la résine (dans les premiers millimètres) et afin de se placer exactement dans les mêmes conditions géométriques, il est indispensable pour avoir un rendement de comptage optimum d'obturer les colonnes de résine par un mince bouchon de caoutchouc et de compter la colonne renversée, après avoir, d'un coup sec, fait basculer la résine au niveau du bouchon. Les fractions actives se trouvent dans ces conditions, toujours au fond du puits, et sont donc comptées, avec le maximum de sensibilité.

Cette méthode est exclusivement préparative et comme on le verra, nous avons ensuite utilisé la chromatographie sur papier pour l'ana-



Séparation des fractions iodées plasmatiques

selon la méthode BLANQUET, HEYNIEL, SAVOIE

SCHEMA I

lyse des fractions ainsi isolées. Elle ne peut être utilisée seule, qu'en clinique humaine où elle donne des indications rapides pour l'examen fonctionnel de la thyroïde.

En matière de conclusion, il est évident que les techniques radioisotopiques associées aux méthodes conventionnelles ont permis d'effectuer d'importants progrès. En effet, après le travail fondamental d'HARINGTON (13-14-15) et jusqu'au début de la période atomique, on a noté une stagnation assez considérable dans les recherches concernant le métabolisme thyroïdien. L'utilisation des traceurs a relancé ces recherches et les a amplifié, tout en permettant de saisir la dynamique des phénomènes dans son ensemble ; elle est cependant incapable de préciser de façon absolue la cinétique de synthèse.

Pour pouvoir s'assurer qu'un élément est le précurseur d'un autre, il faut isoler séparément dans le temps, ces deux substances et vérifier que la radioactivité spécifique du premier composé est inférieure à celle du second. Cette condition étant d'ailleurs nécessaire mais non suffisante pour établir la filiation. Or la méthode des isotopes, utilisée seule, ne permet pas de connaître la radioactivité spécifique. Et il est nécessaire de mettre en oeuvre une autre méthode pour connaître le nombre d'atomes total.*

En ce qui concerne l'iode, les dosages chimiques (88-89-90) en particulier dans le plasma sont toujours très délicats à effectuer. Ils se terminent tous par une réaction catalytique très capricieuse, faisant intervenir les sels de Cérium, et aucune des méthodes proposées n'a donné entière satisfaction.

---

* Radioactivité spécifique = $\frac{\text{N d'atomes marqués}}{\text{N d'atomes total}}$

Tout au contraire, la méthode par activation permet de doser avec précision les composés iodés en particulier dans le plasma, et récemment COMAR, BLANQUET et coll. (87) ont jumelé la méthode d'activation à la séparation sur résine, et ont pu doser ainsi l'iode thyroxinien en valeur absolue. Il est à remarquer que la fraction 2 peut être aussi déterminée de la même manière et qu'elle constitue une fraction non négligeable de l'iode plasmatique total.

L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que l'on doit opérer à proximité immédiate de la pile, étant donné la production d'iode 128 (période 28 minutes).

NOMS	Diagnostic	Iode lié à la fraction 3 µg/100 cm³	Iode lié à la fraction 2 µg/100 cm³	Fraction 2 + 3 µg/100 cm³	Iode total µg/100 cm³	Ecart %
M. M.	Légère hyperthyroïdie	6	1,3	7,3	7,10	+ 3 %
Enf. U.	Goître toxique	9,3	1	10,3	11	- 6,5
Mme S.	Goître	10,3	2,15	12,45	12,2	+ 2
M. R.	Basedow	10	1,8	11,8	12,3	- 12
M. M.	Hyperthyroïdie majeure	29	2,4	31,4	32	- 2
Mme S	Adenome toxique	8	1,5	9,5	13	- 27
Mme A.	Basedow après traitement	11,6	2,9	14,5	16,5	- 14
Mme C.	Cardiothyréose traitée	8,8	1,02	9,82	20,2	- 56
Mme M.	Hyperthyroïdie traitée	20	4	24	30,4	- 18

TABLEAU II

CHAPITRE II

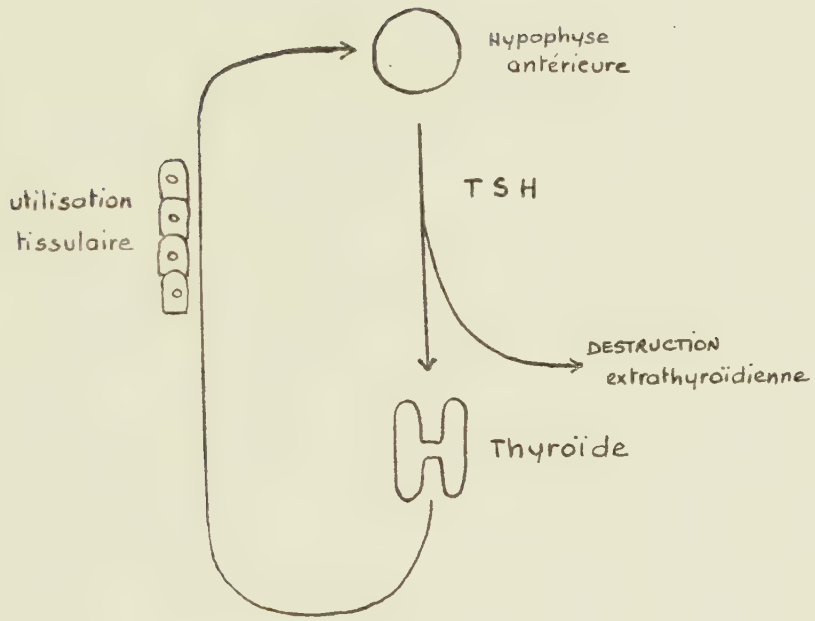
CONTROLE DU METABOLISME THYROIDIEN

La thyroïde fait partie d'un large complexe endocrinien et c'est un aphorisme de dire que son métabolisme est contrôlé par le lobe antérieur de l'hypophyse. On sait, en effet, que ce dernier secrète des stimulines spécifiques qui s'adressent à chacune des glandes endocrines (pour la thyroïde : hormone thyréotrope TSH).

La TSH stimule la cellule thyroïdienne et , en conséquence, la production des hormones. Celles-ci sont secrétées dans le sang, portées au niveau des tissus et métabolisées ; une petite fraction, cependant, revient à l'hypophyse où elle agit comme freinateur. Donc, il existe un balancement permanent et subtil entre la quantité de TSH secrétée par l'hypophyse et la quantité d'hormone qui revient à son niveau.

Si une quantité trop importante de TSH est secrétée, il s'ensuit une concentration intra-thyroïdienne d'hormone élevée, qui passe dans le sang,une fraction de cette dernière, plus importante que de coutume freinera l'hypophyse et en conséquence, au cycle suivant, la TSH sera secrétée en plus petite quantité. Il s'agit d'une régulation en retour où selon le terme consacré d'un "feed back" (Schéma 11).

Cependant depuis une dizaine d'années, on pense que l'hypophyse n'est pas seule à intervenir dans le contrôle de la thyroïde (ceci est d'ailleurs vrai pour toutes les autres glandes endocrines). Il est même actuellement démontré que l'hypophyse n'est pas l'élément primordial de ce contrôle et qu'elle reçoit ses ordres d'un organisme



" FEED BACK "

SCHEMA II

plus central (à vocation cybernétique) qui est l'hypothalamus antérieur.

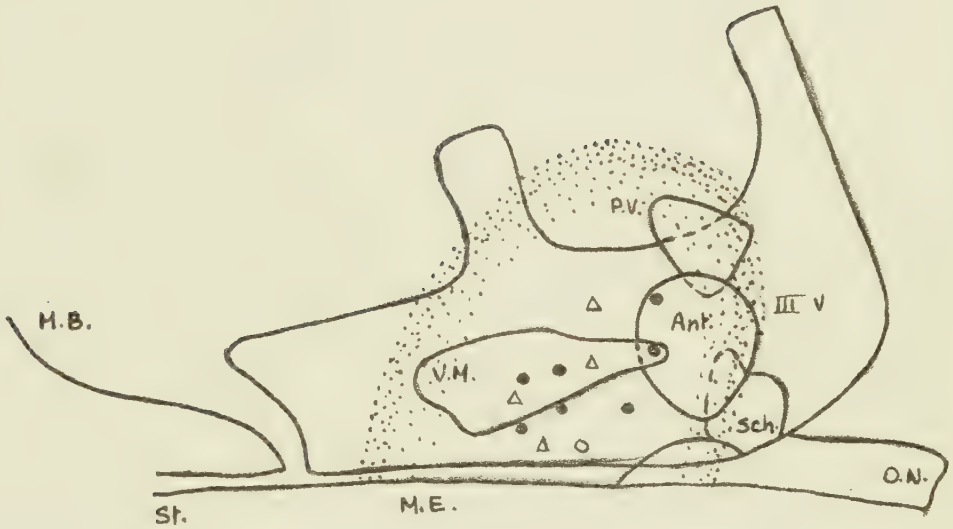
Cette conception a tout d'abord été une hypothèse de travail, mais les évidences expérimentales se sont accumulées et actuellement il faut admettre que l'hypothalamus est le véritable cerveau endocrinien.

A ce sujet, disons brièvement que GREER et coll. dès 1951 ont montré que lorsque on lèse l'hypothalamus antérieur, dans une zone bien définie par stéréotaxie, on inhibe chez le rat l'action classique d'hypertrophie cellulaire provoquée par le PTU et d'autre part, que ces animaux présentent du point de vue biochimique un métabolisme intermédiaire entre celui des hypophysectomisés, et celui des animaux normaux. BOGDANOVE (96-97) FLORSHEIM (99), GANONG (98) etc...

Dès 1953, HARRIS (100-101-102) utilisait également une technique expérimentale très intéressante : section de la tige pituitiare. Il constatait qu'à la suite de cette intervention, les animaux présentaient de même un métabolisme intermédiaire entre l'hypophysectomisé et le témoin. Malheureusement, l'effet de la section n'est que très transitoire, car la réanastomose survient au niveau des capillaires de la tige. Pour pallier cet inconvénient, ces auteurs avaient interposé une mince paroi de cellophane entre les lèvres de la section et constataient alors la permanence des effets.

Enfin, à l'opposé HARRIS (100-101-103-104-105-106-107) et coll. avaient non plus lésé, mais stimulé l'hypothalamus antérieur et mis en évidence une accélération du métabolisme thyroïdien.

Parallèlement dès 1954, puis en 1958, TOBIAS & BLANQUET (108-109) étaient parvenus à localiser au niveau de l'hypothalamus antérieur du rat, soit des protons de 175 MEV soit des deutons de 275 MEV, soit enfin des particules α de 800 MEV, et montraient que cette irradiation localisée amenait un ralentissement important et permanent du métabolisme thyroïdien. Le schéma 111 montre la localisation de la zone sensible dans laquelle il est nécessaire d'intervenir pour obtenir un



SCHEMA III

Schema reproduit de YAMADA (110)

La zone de GREER est délimitée par le pointillé

PV = noyau paraventriculaire
III V = 3e ventricule
Ant = zone hypothalamique antérieure
Sch = noyau suprachiasmatique
VM = noyau ventromédian
ME = éminence médiane
MB = corps mamillaire
St = tige pituitaire

un effet. Cette zone porte le nom de zone de GREER.

On peut d'ailleurs obtenir des effets thyroïdiens semblables en agissant non plus par stéréotaxie, section de la tige, ou encore irradiation, mais par micro-injections de thyroxine dans la zone de GREER (YAMADA) (1961) (110).

Ces dernières expériences très démonstratives montrent, que l'hypothalamus antérieur est également sensible au "feed-back" thyroxinien.

Mais, les expériences définitives devaient être faites par hypophysectomie suivies de greffe (hétéro ou homogreffes). En effet, dans le cas de la stéréotaxie, des sections de la tige et de l'irradiation, on pouvait toujours prétendre que la région lésée pouvait présenter une zone de sclérose ou de nécrose non fonctionnelle, cause d'erreur non négligeable. Il était donc évident que les seules expériences apportant une certitude absolue seraient celles qui réaliseraient une section définitive de la tige suivie d'hypophysectomie avec greffe de cette hypophyse, loin de son site habituel, coupant ainsi définitivement les connections hypothalamo-hypophysaires.

Ce type d'expérience n'a pu être réalisé que ces dernières années. (bien que la pratique des greffes soit très ancienne) (111-112-113-114-115-116- 117-118). On a pu, par exemple, obtenir des homogreffes hypophysaires fonctionnellement actives au niveau de la capsule du rein. (119-120-121-122-123).

Le bilan thyroïdien pratiqué chez de tels animaux montre que leur métabolisme thyroïdien, comme dans les cas précédents, est intermédiaire entre celui des animaux témoins et hypophysectomisés.

Cette conception de la prédominance de l'hypothalamus étant solidement établie, on pouvait penser que l'hypothalamus antérieur avait la possibilité de secréter certaines substances hormonales qui cheminant le long des filets nerveux descendaient jusqu'à la tige hypophysaire pour être éventuellement stockées au niveau de la neuro-hypophyse et agir aussi par neuroerinie au niveau de l'antéphypophyse après

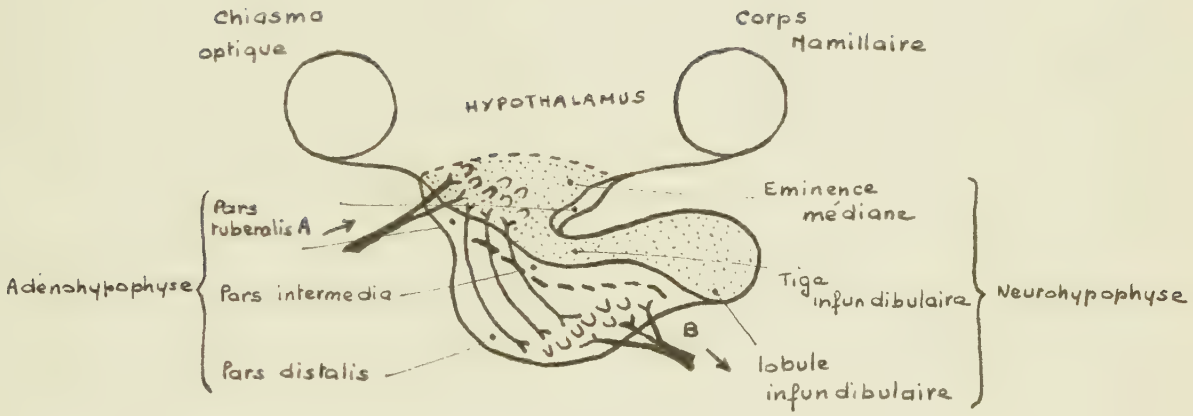
passage à travers les capillaires du système porte. (+) (++) (Schéma IV.)

On pouvait imaginer que de telles substances auraient la possibilité de stimuler l'hypophyse et d'augmenter la secrétion de stimuline anté-hypophysaire. Ce pas fut vite franchi, et permit à GUILLEMIN (124) d'isoler à partir de l'hypothalamus une substance active sur l'hypophyse et augmentant la production d'hormones cortico-surrénales (CRF = corticoréleasing factor). Parallèlement en ce qui concerne la thyroïde, une série de chercheurs Japonais, au premier rang desquels, il faut citer SHIBUSHIWA firent des expériences très intéressantes et parvinrent à isoler un TRF (thyrotropin-releasing factor) qui semble être un peptide dont l'injection provoquait une stimulation du métabolisme thyroïdien. (125-126-127-128-129-130-131)

Ces recherches ont fait l'objet de nombreuses critiques plus ou moins valables mais à notre connaissance, elles n'ont jamais été infirmées. On doit retenir des travaux de l'Ecole japonaise, le fait que le TRF circule dans l'organisme, en particulier dans le plasma, et qu'il est éliminé par l'urine.

(+) Nous n'avons pas jugé utile même succintement, de donner l'anatomie de la région hypothalamique, d'excellentes revues générales existent sur ce sujet.

(++) En effet, jusqu'à ces derniers temps, on considérait que l'anté-hypophyse était absolument indépendante de la neurohypophyse, mais des relations intimes, et en particulier vasculaires, existent entre ces deux régions. (BERDE) (132).



REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE LA NEUROHYPOPHYSE ET DE SA LIAISON VASCULAIRE AVEC L'ADÉNOHYPOPHYSE, LA CIRCULATION PORTE DE L'HYPOPHYSE

d'après BERDE (132)

SCHEMA IV

Nous avons été très intéressés par ces recherches et aussi en raison de certaines contradictions qui seront exposées dans le prochain chapitre et qui portent sur le métabolisme thyroïdien lui-même, nous avons pensé qu'il serait nécessaire de pratiquer sur le plasma, des investigations plus poussées, pour voir si ce plasma n'est pas susceptible de renfermer d'autres substances que celles habituellement décrites, douées d'activité hypophysiotrope, ou hormonale.

Nous verrons que ce but n'a été que partiellement rempli, mais que nous avons pu mettre en évidence, des substances dont la présence n'avait pas encore été signalée.

CHAPITRE III

NOUVELLES DONNEES EXPERIMENTALES

Certes, des progrès notables concernant l'étude du métabolisme thyroïdien, ont été faits depuis l'apparition des indicateurs nucléaires. Cependant, certaines incertitudes persistent ; quelques unes nous semblent fondamentales.

1° Du point de vue clinique, et c'est un point de vue parallèle que l'on ne peut guère négliger, il est évident que l'on ne connait pas, à l'heure actuelle, l'étiologie de certaines hyperthyroïdies, et en particulier de la maladie de BASEDOW ; car, s'il est vrai que sur le plan physiologique, la thyroxine, agit comme freinateur au niveau de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus, il devrait exister une substance accélératrice qui provoquerait une hypersecrétion de TSH. (TRF, mais sa structure n'a pas encore été élucidée).

2° En ce qui concerne le mode de formation de l'hormone, c'est une opinion classique de penser que la MIT et la DIT sont les précurseurs des hormones, et qu'il y a couplage de 2 molécules de DIT pour former une molécule de T_4, de 1 MIT et de 1 DIT pour former une molécule de T_3, avec dans les deux cas, élimination d'un reste d'alanine, qui à la vérité, n'a jamais été formellement isolé.

Si l'en est bien ainsi, la radioactivité spécifique de la molécule de MIT isolée de la thyroïde doit être inférieure à celle de la DIT, elle-même inférieure à celle de T_3 et de T_4. Il n'en est pas ainsi, cependant, il faut dire que les déterminations de radioactivité spéci-

fique n'avaient pas été faites jusqu'à une période relativement récente, étant donné la difficulté et la longueur des dosages d'iode 127, Actuellement, la méthode par activation a permis d'effectuer ces déterminations.

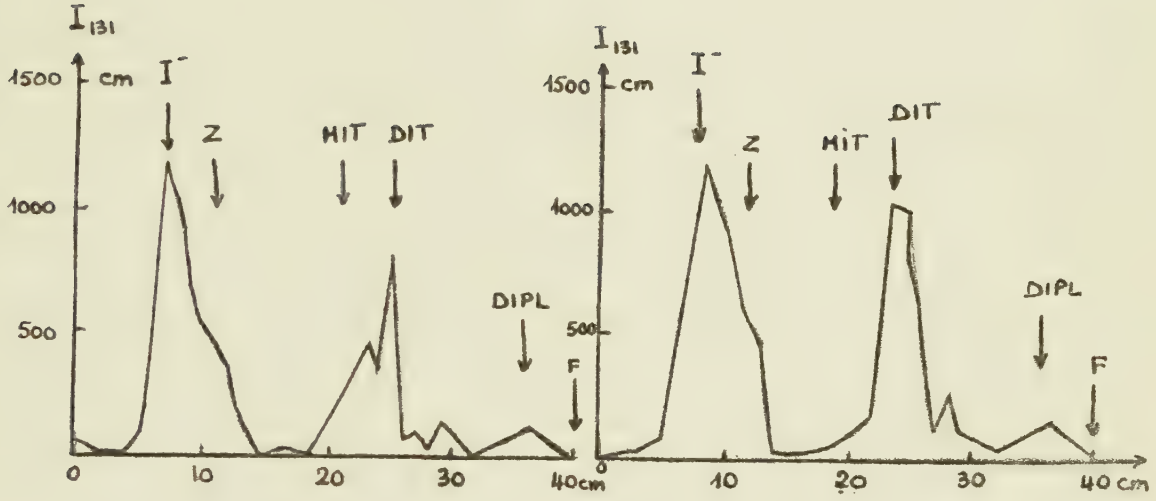
Donc pour la synthèse intrathyroïdienne des hormones, une discussion est ouverte, et il n'est pas improbable qu'elles puissent se former d'une manière toute différente.

3° Dans le sang, lorsque l'on examine les composés iodés qui apparaissent la théorie habituelle signale, lorsqu'on opére avec 131 I, l'iodure, les hormones (T_4+T_3), éventuellement T_2. Par ailleurs, par analyse chimique, ou mieux par activation, on peut mettre en évidence trois fractions : une fraction iodure, très faible, une fraction d'hormones variable suivant l'état de la thyroïde, enfin une 3ème fraction constituée par des protéines ou des peptides (déjà isolés par la méthode à I 131 - fraction 2 - de BLANQUET)

Le tableau 11 emprunté à COMAR montre qu'exprimée en microgramme par 100 millilitres, cette fraction n'est absolument pas négligeable et que dans certains cas, elle peut constituer jusqu'au 1/3 de l'iode plasmatique.

C'est d'ailleurs probablement des composés du même type qui constituent les bandes inconnues sur les chromatogrammes radioactifs de thyroïde : bande de départ importante, composée à faible migration dont le rf était voisin de celui des iodures. (Z de ROCHE) (133) (Schéma V)

4° On n'est pas encore très bien fixé sur la structure des protéines accompagnant les hormones malgré le nombre important de travaux effectués à ce sujet, et d'autre part, du point de vue biologique, une contradiction importante subsiste, qui est constituée par la vitesse avec laquelle l'hormone agit. On sait, en effet, que pratiquement, toutes les hormones sauf la thyroxine, possèdent une action physiologique très rapide, et agissent dans les quelques minutes qui



SCHEMA V d'après ROCHE et coll. (133)

Radiochromatogrammes en solvant n-butanol-acide acétique-eau (78/5/17), des urines des deux premières heures après administration de DIT marquée

Abscisses : longueur en centimètres
Ordonnées : nombre de coups par minute
O : origine F : front (A) Cas 1 : M... (B) Cas 2 : I... I^m : iodures
Z : corps inconnu HIT : 3-monoïodotyrosine DIT : 3,5-diiodotyrosine
DIPL : acide 4-hydroxy-3,5-diiodophénylactique

suivent l'administration (insuline, vasopressine, ocytocine etc...) Pour la thyroxine, il faut attendre 9 heures environ pour constater son action.

5° Enfin, les données actuelles concernant le plasma nous paraissent très paradoxales. En effet, s'il est tout à fait évident d'admettre que la T_4 et la T_3 circulent dans le plasma, et par conséquent qu'elles ont pu franchir la barrière de la cellule thyroïdienne, il semble difficile d'admettre dans ces conditions, que des molécules plus petites, de poids moléculaire beaucoup plus bas, donc de plus faible encombrement, ne puissent franchir la même barrière. Il faut, pour expliquer ce paradoxe, faire intervenir un enzyme spécifique : la tyrosine-désiodase, qui aurait la propriété de désioder à l'intérieur de la thyroïde, les molécules de MIT, de DIT non utilisées pour la synthèse des hormones en respectant les thyronines.

D'ailleurs, la realité de cette tyrosine-désiodase n'a jamais été absolument démontrée.

Certes, dans ces cas pathologiques, cancer, ou maladie de Hashimoto etc..., on trouve bien dans le sang, des substances dites "protéine X de ROBBINS", qui, par hydrolyse donne DIT et MIT, mais ces dernières, jusqu'à une époque récente, n'avaient jamais fait l'objet d'isolement dans le plasma, à l'état libre et dans des conditions physiologiques.

Cependant, récemment, WERNER et coll. (134) dans un article qui a soulevé de nombreuses controverses ont fait une série d'expériences portant sur le plasma : extraction suivie de chromatographie, et analyse de ces chromatogrammes, non plus en I 131, mais en I 127. Ils ont montré que pour les rf moyens, il existait sur le chromatogramme, une quantité d'iode 127 très importante, localisée sensiblement au niveau des rf de la MIT et de la DIT.

Dans leurs conclusions, ils déclaraient que si ces substances n'avaient pu être détectées par I 131, c'est que leur période dans

l'organisme était trop courte, et que leur désiodation suivait rapidement leur formation et leur secrétion par la thyroïde. Ce qui excluait, dans ce cas, presque formellement l'emploi des indicateurs nucléaires.

A la suite de nos recherches expérimentales, nous donnerons une interprétation possible des constations de WERNER.

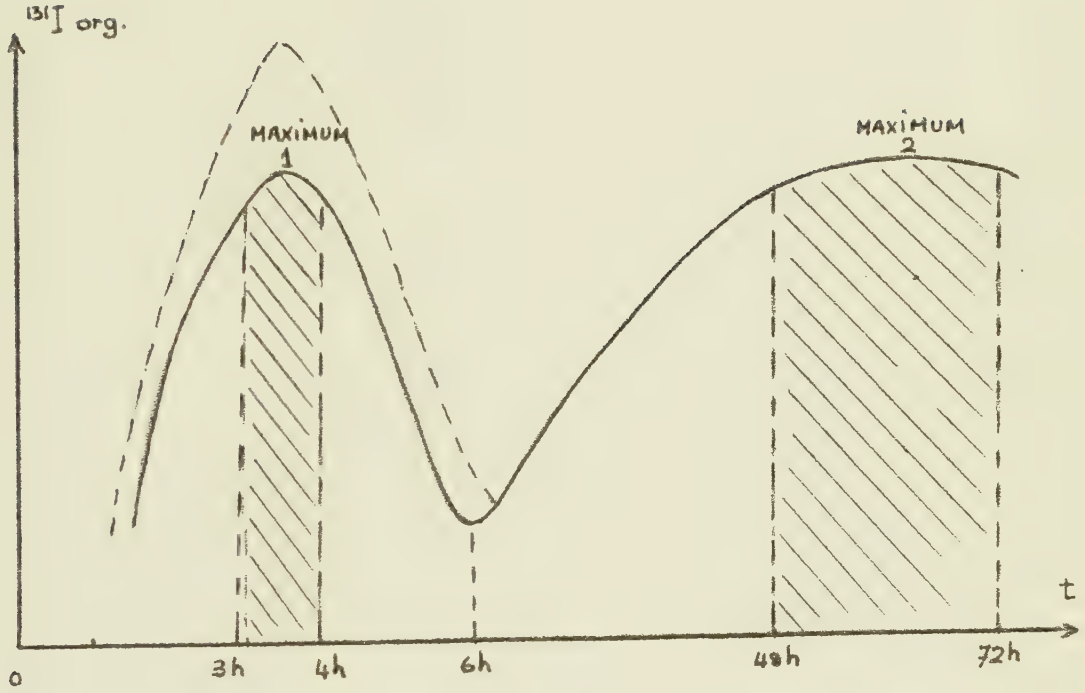
Toutes les données précédentes, jointes aux conclusions que nous avons exposées dans le Chapitre II, nous ont incités à penser qu'il devait exister un ensemble de substances dont la détection n'avait pas encore été réalisée soit dans la thyroïde, soit dans le plasma. C'est le problème que nous avons essayé de résoudre, dans la partie expérimentale qui suit...

D'une manière beaucoup plus générale, on a donc été amené à penser qu'il existait un autre pool iodé différent de ceux connus habituellement, pour des iodures et les hormones.

Nos recherches ont d'abord porté sur des déterminations globales concernant l'iode organique. Nous avons, en effet, constater que si l'on effectuait des déterminations de l'iode organique, à des stades précoces, après l'administration de traceur, soit par une méthode de précipitation, (PBI), soit par une méthode d'extraction (BEI) ; on pouvait mettre en évidence un phénomène assez intéressant qui correspondait à une flèche d'iode organique, dans les premières heures qui suivent l'injection, selon le Schéma VI (135)

L'amplitude du phénomène est assez importante puisque, après injection de 50 µc de 131 I, chez le rat, si on effectue des prélèvements toutes les demi-heures, par exemple, on constate l'existence d'une flèche dont le maximum atteint 3 000-4 000 coups en moyenne dans nos conditions de comptage.

Il existe, d'ailleurs, une méthode plus facile pour mettre en évidence cette fraction organique fugace. Il suffit de soumettre le plasma à une résine DOWEX 50, selon la méthode déjà préconisée par



SCHEMA VI

Variation de l'iode organique circulant en fonction du temps

MEYNIEL et coll. (80). Cette résine, lavée abondamment au moyen d'eau distillée, laisse passer tous les composés minéraux iodés. Elle est ensuite comptée.

Nous avons pu dans cet ordre d'idées, parvenir à augmenter l'amplitude de ce phénomène rapide, dans des proportions assez importantes, en utilisant selon les indications de CROIZET et coll. (122-136-137) l'administration simultanée d'ocytociques. Le résultat sera montré dans le schéma VII.

Ce phénomène important a une durée de vie de 9 heures environ, et est suivi d'une remontée de la courbe qui correspond à la secrétion des thyronines.

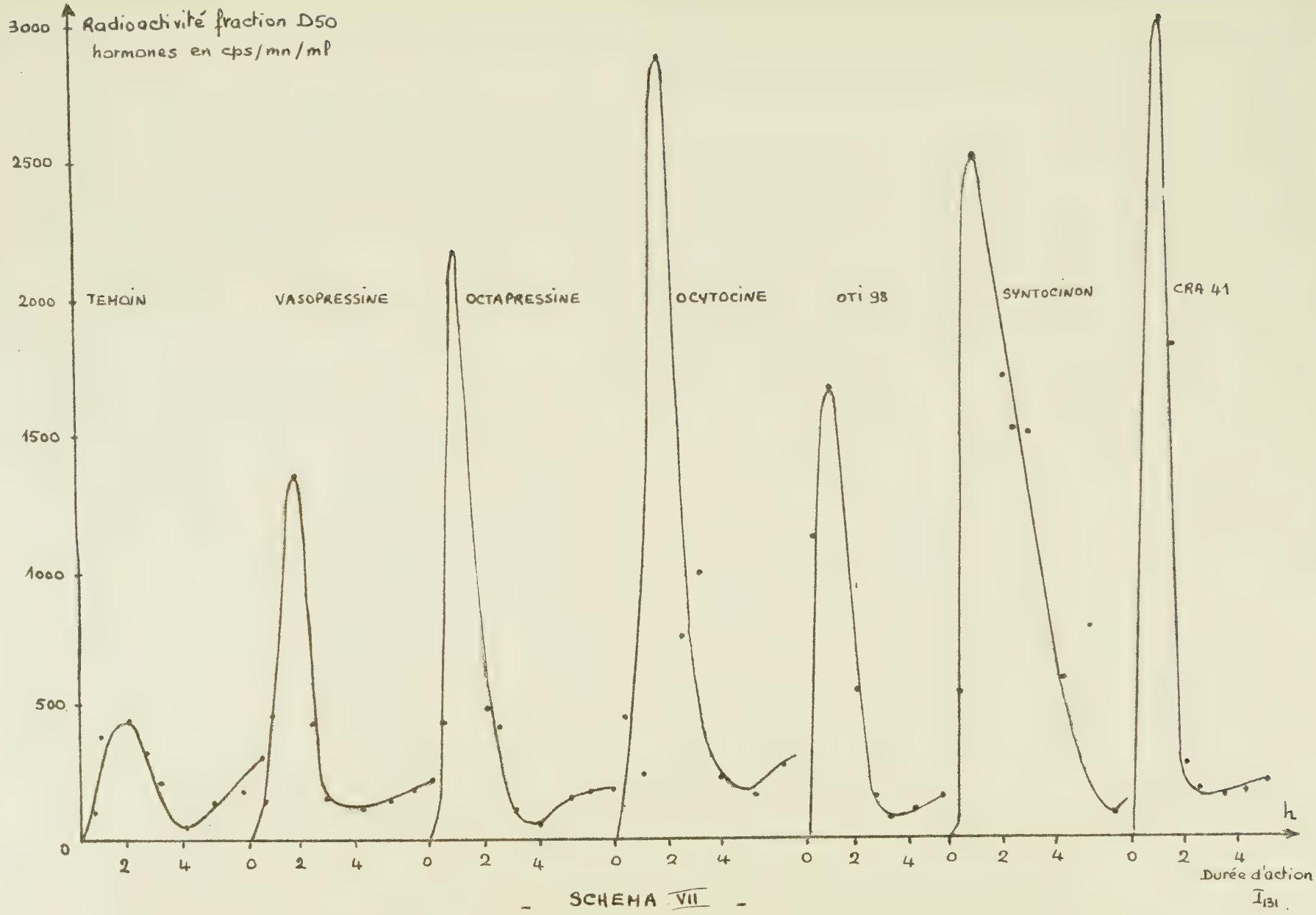
Il a été également mis en évidence chez l'homme par COLLR,RIVIERE, BLANQUET, KELLER SHOHN (139), et très récemment MEYNIEL (140) a pu constater sa présence non plus dans le plasma, mais dans le sang total, ce qui implique une participation importante des hématies.

Autre conclusion intéressante : l'action semblant sélective des hormones post-hypophysaires, sur ce phénomène rapide.

En réalité, on sait maintenant que ces hormones sont très vraisemblablement d'origine hypothalamique et nombreux sont les travaux concernant l'influence possible de ces substances sur le métabolisme thyroïdien.

De très nombreuses expériences dans ce sens ont été faites pour augmenter éventuellement la secrétion de TSH, BORREL 1945 (141), BARTHOLOMEI et MARCHETTO 1955 (142) CURRI & FIDELI 1955 (143), OTTAVIANI & AZZALI 1955 (144), SPIGOLON 1955 (145), SHIBUSHAWA 1956 (126-127-128), BAKKE 1958 (146) etc...

Ces auteurs ont pu montrer que l'injection d'extraits hypothalamiques produisait une stimulation de la thyroïde, ce qui plaide en faveur d'un mécanisme neuro-humoral pour le contrôle hypothalamique. En effet, le neuro-secrétat peut se rendre directement à la post-hypophyse et également gagner la préhypophyse (SCHARRER) (147) (GREEN &


Radioactivité fraction D50
hormones en cps/mn/ml
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
TEMOIN
VASOPRESSINE
OCTAPRESSINE
OCYTOCINE
OTI 98
SYNTOCINON
CRA 41
h
2 4 0 2 4 0 2 4 0 2 4 0 2 4 0 2 4 0 2 4
Durée d'action
I_{131}

- SCHEMA VII -

HARRIS) (148) (BENOIT & ASSENMACHER) (149).

Certains auteurs tels DUBREUIL & MARTINI (150) affirment que ces mêmes hormones sont aussi des excitants de la préhypophyse.

OGAWA 1956 (151), DUBREUIL & MARTINI (150), BOTTARI (153) avaient suggéré que la vasopressine était aussi capable d'accroître le métabolisme thyroïdien. MERTZ (153-154-155) avait montré que cette substance stimulait la thyroïde. Plus récemment, MAEDA (156) a déterminé le retentissement de ces hormones polypeptidiques sur le métabolisme thyroïdien. Chez le rat, le chien et l'homme, l'injection sous-cutanée de vasopressine se traduit au niveau plasmatique par une augmentation immédiate du taux de TSH associée à une forte accélération de la fonction thyroïdienne. L'animal hypophysectomisé ne manifeste aucune réaction, celui ayant subi une section de la tige avec mise en place d'une plaquette isolante entre les deux lèvres de la section réagit comme l'animal normal. Ces faits permettaient, pour MAEDA, d'envisager une action de la vasopressine sur le système hypophyso-thyroïdien.

Pour SCHLINDER (157) par contre, ce serait une action directe sur la thyroïde, qui entraînerait une augmentation du taux de TSH à la suite d'injection de vasopressine.

Il faut préciser que les résultats mentionnés sur le schéma VII, ont été obtenus avec des hormones hypothalamiques de synthèse (SANDOZ-Bâle) car les substances d'origine extractive ne nous ont pas donné entière satisfaction dans la reproductibilité des résultats (cf COVILLAULT) (158), sont d'ailleurs toujours susceptibles de renfermer de petites quantités de TSH.

En conclusion de ces recherches préliminaires, il était possible d'avancer deux propositions.

1°- Il existe certainement un pool à métabolisme rapide, différent de celui des hormones.

2°- L'administration de substances hypothalamiques synthétiques exagère ce phénomène rapide,(ce qui suggère éventuellement une

similitude de structure de ces substances avec le TRF).

Ces déterminations préliminaires ne préjugeaient cependant pas de la nature de cet iode organique. C'est pourquoi nous avons cherché à isoler des fractions analysables , tout d'abord dans la thyroïde (pour éventuellement détecter les substances qui pourraient être les précurseurs des substances plasmatiques), et ensuite dans le plasma.

1 - T H Y R O I D E

Nous avons déjà eu l'occasion de signaler au chapitre 1, les méthodes d'analyse concernant les hydrolysats thyroïdiens.

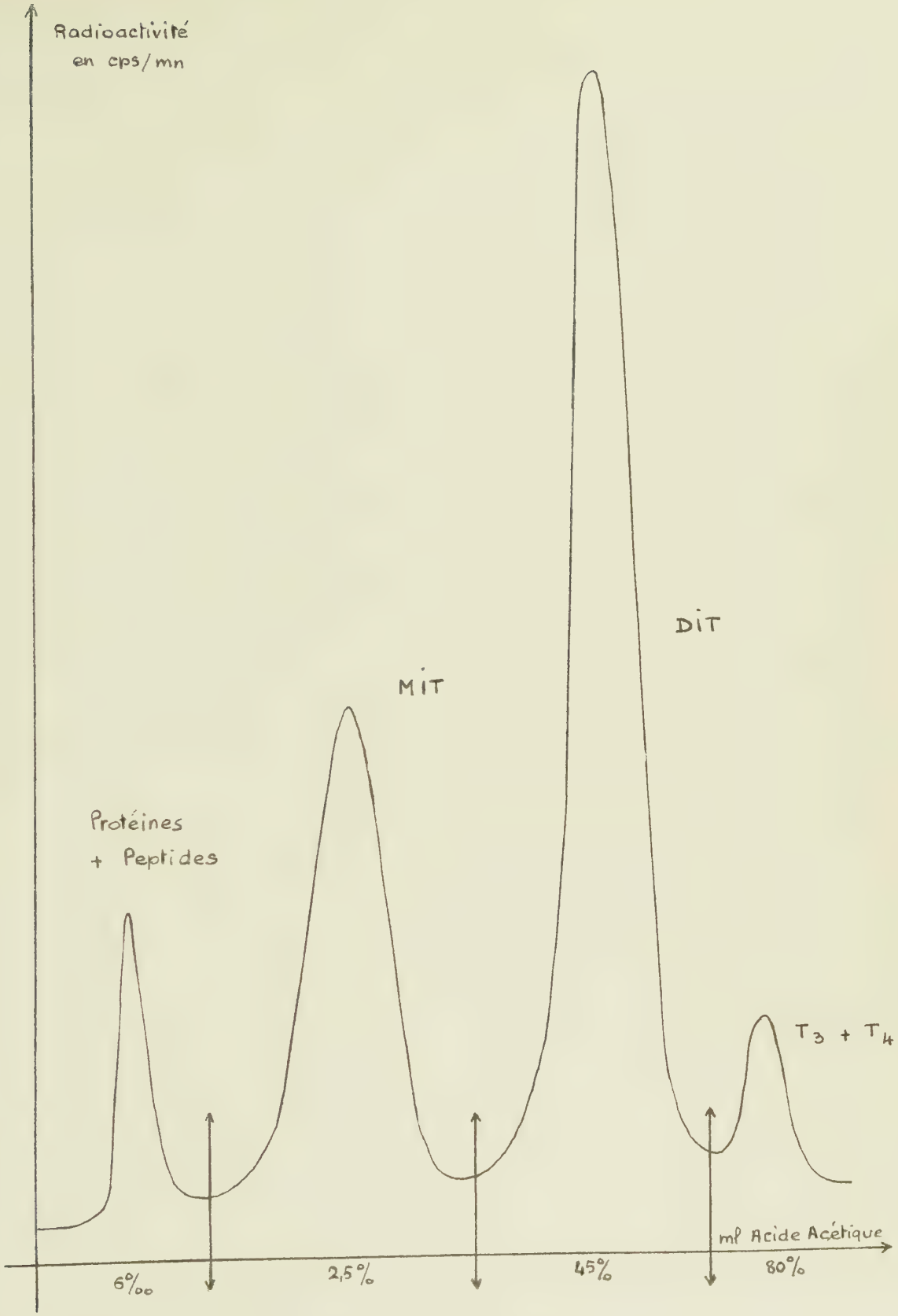
Chromatographies sur papier, sur colonne, mettent en évidence facilement les substances iodées après hydrolyse pancréatique.

Du point de vue quantitatif, BLANQUET et coll. (76-77-78-79-80), utilisaient une méthode avec DOWEX 1X2 et c'est une modification de leur technique que nous avons appliquée : élution de la colonne par des concentrations d'acide acétique de pH décroissants.

- Elution par CH_3COOH à 0,6 %... Protéines et peptides iodés.
- Elution par CH_3COOH à 5 à 10 %... MIT
- Elution par CH_3COOH à 45 %... DIT
- Elution par CH_3COOH à 80 %... Thyronines (T_4 et T_3)

Dans ces conditions, nous avons montré qu'il existait quatre pics radioactifs ; le permier ayant fait l'objet des investigations rapportées ci-dessous. (Schéma IX)

Des rats mâles, souche Wistar, d'un poids moyen de 250 g. reçoivent une injection de 50 µc de ^{131}INa, accompagnée d'une injection de 0,1 unité de vasopressine ou d'ocytocine (produit synthétique SANDOZ) qui a pour but d'augmenter très sensiblement l'amplitude du phénomène rapide plasmatique.



SÉPARATION des Fractions Iodées Organiques dans la thyroïde

SCHEMA IX

Les animaux sont sacrifiés 1-2-3 heures après l'administration du traceur. Les thyroïdes sont soigneusement prélevées et mises à hydrolyser à pH 8,4 en présence de pancréatine (Armour, CHICAGO) à 37° à l'étuve pendant 48 heures. Au bout de ce temps, une partie aliquote de l'hydrolysat est prélevée et déposée à la partie supérieure d'une colonne de DOWEX 1X2, 200-400 mesh, forme OH^-. Au moyen d'un collecteur, on recueille des fractions d'un millilitre qui sont comptées dans un compteur puits, en spectrométrie γ. Les différents liquides radioactifs ainsi obtenus sont concentrés sous pression réduite à une température ne dépassant pas 30°, jusqu'à si cité. Le résidu est repris par quelques gouttes d'ammoniaque dilué et déposé sur une feuille de papier à chromatographie (Whatmann n°1), puis mis à migrer en Partridge diphasique(saturation préalable de 24 heures ; durée de la migration : 14 à 16 heures ; température ambiante : 18 - 20°). Le chromatogramme est ensuite séché et divisé en 3 parties : la première révélée à la ninhydrine, la seconde mise en contact avec un film sensible, la troisième comptée soit avec un lecteur automatique de chromatogramme (compteur à fenêtre mince), soit après découpage en bandelettes de 0,5 cm au passeur d'échantillons (compteur puits en spectrométrie γ).

Chez l'animal normal, c'est la bande 0,18 qui est la plus intense, mais si l'on stimule la thyroïde par une injection préalable d'ocytocine (0,1 unité par rat), il y a transfert d'une partie de la radioactivité vers la bande 0,45. Dans le cas d'une injection de vasopressine, la bande 0,18 reste très intense, mais on voit apparaître une nouvelle bande radioactive et ninhydrine$^+$ à 0,12. La TSH au moins au stade où nous avons expérimenté, c'est-à-dire 3 heures après l'injection du traceur, ne donne pas d'effets nettement différents de l'animal normal.

Enfin, si on poursuit le fractionnement et si on élue successivement MIT, DIT, on ne constate pas, par contre, sous ces diverses influences de modifications notables dans le rapport de la radioactivité MIT/DIT

Ceci nous donne à penser que cette première fraction, isolée au moyen de CH_3COOH 6 ‰, doit être très importante du point de vue métabolique puisque c'est à son niveau que l'on constate pratiquement de façon immédiate, des modifications sensibles lorsqu'on agit sur la thyroïde.

Sur une suggestion de MEYNIEL (159), nous avons été amenés à adopter la modification qu'il a proposé et à suivre la technique suivante :

La désorption des composés iodés est réalisée au moyen de 3 Eluants successifs.

1°- solution aqueuse d'HCL 0,20 (contenant 3,75 % de n-butanol) permet l'obtention de 3 fractions bien distinctes.

2°- solution de salicylate de sodium (0,5 M) perfusée à la suite de la précédente, fournit une quatrième fraction iodée.

3°- enfin, une solution d'éthanol contenant 600 ml d'acide acétique par litre, permet d'éluer une cinquième et dernière fraction.

Le schéma X, résume l'ensemble des résultats de l'élution successive des divers composés iodés d'un hydrolysat thyroïdien.

L'examen chromatographique (Partridge -wh2) de chacune des fractions radioactives isolées permet d'identifier parfaitement les iodures, la MIT, la DIT et la $T_3 + T_4$. On note de plus, la présence d'autres composés iodés, dont le plus important possède un Rf voisin de celui des iodures et se confond souvent avec le spot de cet halogène (photo 1). Si l'on soumet à l'analyse chromatographique sur papier le seul pic N° 1 éluée d'une colonne de DOWEX 1X2, après concentration, on détecte parfaitement 4 constituants iodés nettement séparés par un cinquième plus inconstant. (Photo 2). Leurs rf sont les suivants : 0,06 - 0,12 - 0,18 - 0,40 - 0,60.

L'importance relative de ces différents composés varie en fonction du temps après l'injection d'iode à l'animal.

Ces composés se colorent en violet à la ninhydrine et donne la

PHOTOGRAPHIE N° 1

Désorption des composés iodés d'un hydrolysat thyroïdien à partir d'une DOWEX 1X2 - chromatographie en Partridge biphasique - Whatman n° 2 -

De gauche à droite, on trouve successivement :

- hydrolysat avant passage sur résine.
- pic n° 1 - pic complexe composé de plusieurs fractions iodées distinctes.
- pic n° 2 - MIT - rf 0,52
- pic n° 3 - DIT - rf 0,64
- pic n° 4 - I^- - rf 0,21
- pic n° 5 - T_3+T_4 - rf 0,83

- - - - - - - - - - -

PHOTOGRAPHIE N° 2

Chromatographie sur papier Whatman n° 2 - en Partridge biphasique du pic n° 1. On détecte parfaitement 4 constituants iodés nettement séparés et un cinquième plus inconstant - Leurs rf sont les suivants :

- 0,06
- 0,12
- 0,18
- 0,40
- 0,60

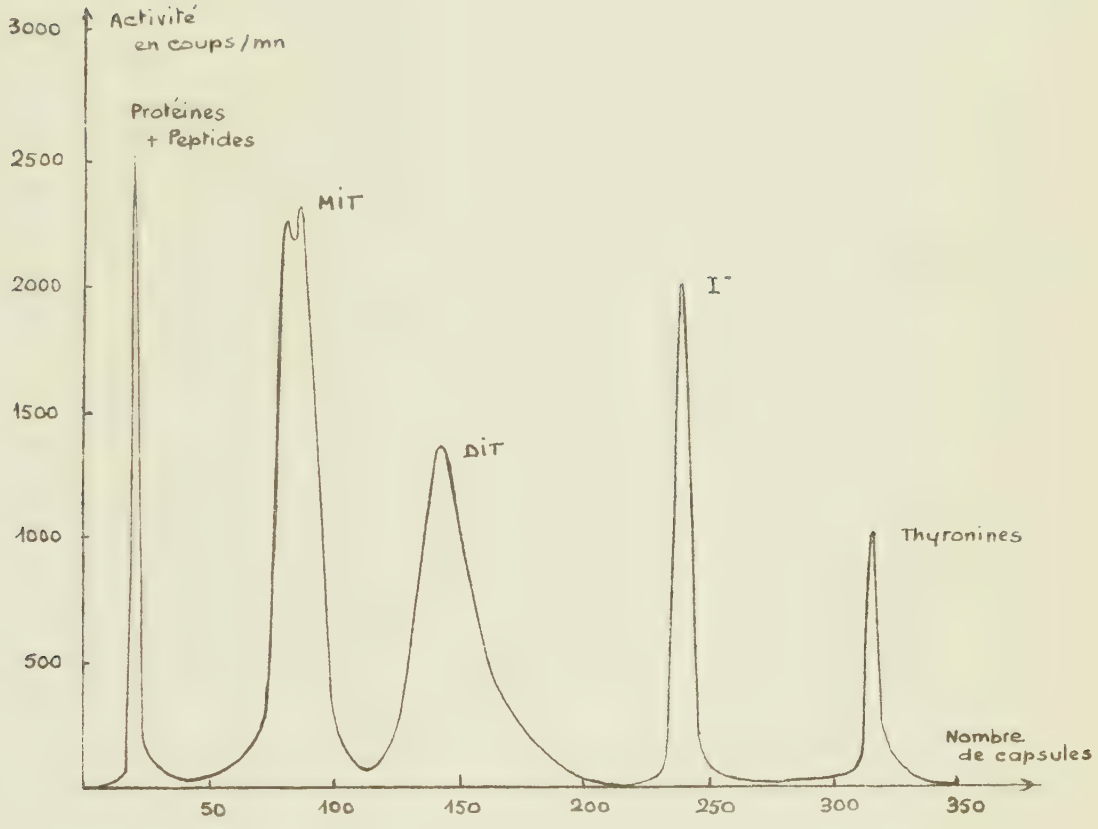
- - - - - - - - - -

PHOTOGRAPHIE N° 2

Chromatographie sur papier Whatman n° 2 - en Partridge biphasique du pic n° 1. On détecte parfaitement 4 constituants iodés nettement séparés et un cinquième plus inconstant - Leurs rf sont les suivants :

- 0,06
- 0,12
- 0,18
- 0,40
- 0,60

- - - - - - - - - -



Elution à partir d'une DOWEX 1x2 des divers composés iodés d'un hydrolysat thyroïdien selon la technique MEYNIEL (159)

SCHEMA X

réaction du sulfate cérique.

Par une technique différente (DOWEX 1X10 élution par gradient de formiate) LISSITZKY et coll. (160-161-162) avaient montré qu'il existait dans la thyroïde plusieurs peptides A_1-A_2-T_1-B_2. Leur rf correspondent pratiquement à ceux que nous avons trouvé. Cependant, LISSITZKY et coll. ne pensent pas que ces substances possèdent un rôle physiologique important ; (ce seraient simplement des inhibiteurs de T_3 et T_4).

Nous verrons par la suite, qu'il ne semble pas en être ainsi et que les substances plasmatiques que nous avons isolé semblent posséder un rôle physiologique non négligeable.

C'est donc, la recherche des substances plasmatiques issues du métabolisme rapide qui nous a préoccupés, elle a posé de nombreux problèmes de technique et en particulier de désiodation du plasma.

II - P L A S M A

Il est absolument nécessaire d'expérimenter à des stades très précoces après l'injection d'I^{131}, si l'on veut saisir le phénomène rapide et avoir une chance d'isoler les substances qui circulent dans le plasma en ce moment. Dans ces conditions, un problème analytique particulièrement important se pose, celui d'éliminer de façon absolument totale, l'iodure qui se trouve en grande quantité dans le sang à ce stade.

Des expériences préliminaires faites après l'extraction butanolique, nous avaient montré que lorsque l'extraction était effectuée avec du butanol acide (pH 1-2), le chromatogramme en solvant de Partridge montrait des tâches radioactives de rf comprises entre 0,18 et 0,24 - entre 0,80 - 0,85 ou 0,90 - 0,95.

Pour les rf 0,18-0,24 on pourrait penser à la présence d'iodure et pour 0,80 - 0,85 éventuellement aux thyronines, enfin pour 0,90-0,95 aux esters butaloniques de ces substances (WILKINSON) (163). Dans de nombreuses expériences, nous avons fait systématiquement suivre l'extraction butanol-acide par une extraction en butanol ammoniacal (pH 9-10). On sait que l'iodure qui est soluble en phase acide ne passe que très difficilement en phase alcaline, et la chromatographie de ces doubles

extractions met encore en évidence une bande fortement radioactive de rf 0,18 - 0,24, situé au même niveau que l'iodure. Cependant deux arguments sont contre la présence d'iodure : d'une part, celui-ci passe difficilement en phase alcaline, et d'autre part, en développant à la ninhydrine à 80 - 100°, on fait apparaître une large bande rose. L'analyse du chromatogramme est faite par comptage extemporané, ou par autoradiographie. Dans les deux cas ont obtient un dédoublement assez net de la bande radioactive. (schéma XI).

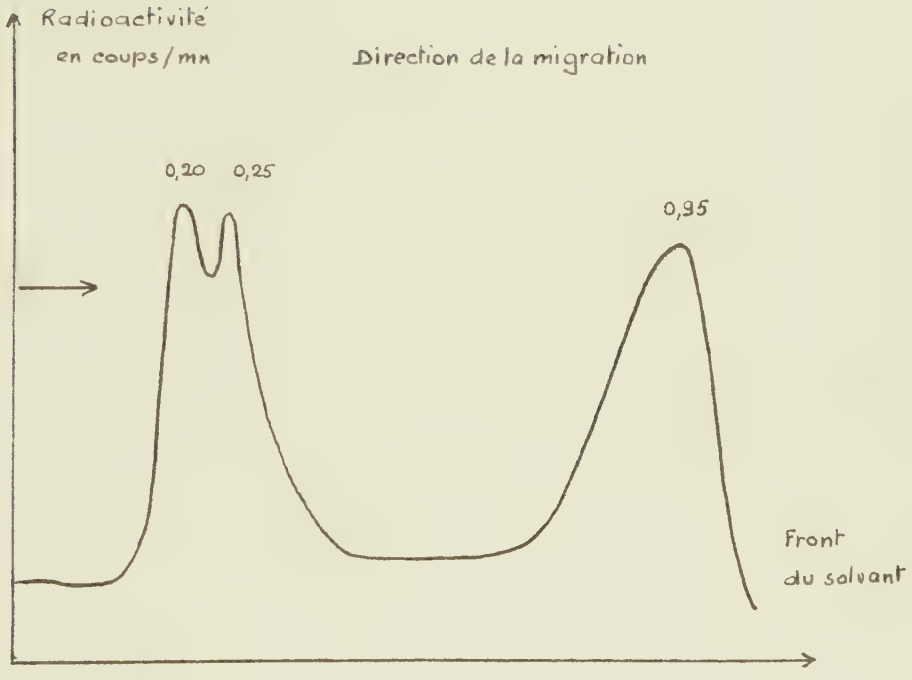
Ces constatations nous ont amenés à penser que le phénomène était semblable à celui constaté dans la thyroïde : surimposé à l'iodure, il existait une série de substances de nature organiques dont il était nécessaire de poursuivre l'isolement. Il faut évidemment signaler que les peptides que nous avions isolés dans la thyroïde correspondaient à des rf du même ordre. Enfin accessoirement, il était tout à fait logique de ne pas retrouver dans le butanol ammoniacal des substances de rf plus élevé (0,80 - 0,85) puisque classiquement les thyronines ou les molécules à deux noyaux aromatiques ne sont pas solubles dans le butanol ammoniacal.

L'examen des résultats précédents posait un problème fondamental, puisque les substances détectées se trouvaient à un rf voisin de celui de l'iodure : assurer au début de l'opération l'exclusion totale et définitive de I^-.

A - Exclusion de l'iodure

Nous avons expérimenté avec plusieurs techniques dont le principe est brièvement résumé ci-dessous et pour lesquelles nous discuterons, avantages et inconvénients.

1° - Techniques dérivées de celles que BLANQUET et coll. (79), puis que GALTON & PITT-RIVERS (82) avaient préconisé pour les hydrolysats thyroïdiens : DOWEX 1X2 (200-400 mesh, forme OH^-), élution effectuée soit par HCL 0,2N + 3,75 % butanol (BLANQUET) (79-78), soit par un gradient d'acide acétique (GALTON & PITT-RIVERS) (82), soit HCL 0,2N + butanol



SCHEMA XI

Schema obtenu par comptage en spectrométrie β d'une chromatographie en PARTRIDGE biphasique, obtenue à partir d'un plasma extrait avec du butanol acide et du butanol ammoniacal, sans désiodération

(3,75 %) suivi acide acétique 60 % (MEYNIEL-BLANQUET) (159). Dans ces conditions, on peut séparer plusieurs fractions organiques iodées identifiables par chromatographie sur papier. Dans tous les cas, l'iode minéral est échangé au sommet de la colonne et la forte sélectivité de la résine anionique garantit une exclusion totale de l'iodure.

2° - Méthode déjà utilisée pour le plasma faisant appel non plus à une seule résine, mais à deux résines différentes. (BLANQUET-MEYNIEL) (86).

a) La première cationique DOWEX 50X2 200-400 mesh forme H^+.

b) La seconde anionique DOWEX 1X2 200-400 mesh forme CL^-.

2 ml de plasma sont versés au sommet du système, et l'élution est assurée soit avec NaCL 0,9 %, soit avec de l'eau distillée.

Cette opération permet d'isoler trois fractions :

1) sur la DOWEX 50, une fraction organique iodée qui correspond aux hormones T_4, T_3, et éventuellement aux tyrosines. Toutes ces substances sont fixées par la résine, et peuvent être éluées au moyen d'ammoniaque 2N. (Fraction 3).

2) sur la DOWEX 1, l'iodure qui est échangé dès le sommet de la colonne, y est très fortement retenu. Il peut cependant être élué au moyen, soit de B2Na 3M, soit d'une solution de salicylate de sodium 0,5 M (l'ion salicylate étant le seul qui présente une plus grande sélectivité que l'iodure vis à vis de la DOWEX 1X2) (Fraction 1)

3° le liquide d'élution des 2 colonnes en série par NaCL, et qui contient de l'iode organique sous forme de protéines et de peptides iodés, constitue la fraction 2.

3° - Soit avant, soit après les extractions obtenues, on peut utiliser une méthode également très simple, consistant dans l'emploi de chlorure d'argent, par précipitation du nitrate d'argent, au moyen de chlorure de sodium (FLETCHER) (1957) (164).

Le principe de cette opération est très simple puisque par simple passage sur la colonne, le liquide est désiodé (double décomposition avec formation d'iodure d'argent insoluble et de chlorure de sodium),

la désiodation est complète, si l'on prend soin de ne pas salurer la colonne en iodure. FLETCHER avait utilisé cette technique pour la désiodation de l'urine et elle nous a semblé excellente. Seules quelques précautions ont à prendre en particulier en ce qui concerne l'éluant. FLETCHER éluait ces colonnes avec de l'éthanol à 50 %, mais nous avons constaté que sur un liquide aussi complexe que le plasma cette élution provoquait une précipitation très génante des protéines. Nous avons préféré soit NaCL 9 ‰, soit l'eau distillée, et constaté qu'avec une colonne d'environ 15 cm de hauteur, et de diamètre 1,5 cm, tout l'iodure était retenu, l'élution étant assurée dans de très bonnes conditions avec 30 ml.

4° - Enfin, nous avons également utilisé des colonnes de dextran (Sephadex), soit avant, soit après traitement du plasma par DOWEX 1X2, mais très récemment, l'apparition des Sephadex échangeuses d'anion, (DEAE), nous a permis d'essayer leurs possibilités, mais nous n'avons pas eu l'occasion d'effectuer un assez grand nombre d'expériences.

Ces méthodes effectuent toutes, une excellente exclusion d'iodure :

a) les résines échangeuses d'ions type DOWEX, sont très intéressantes, mais on peut objecter qu'étant donné la nature de leur groupe échangeur (acide fort - base forte) elles représentent des systèmes assez agressifs pour des substances aussi labiles que : hormones, protéines ou peptides iodés. Elles peuvent, en outre, se comporter dans certaines conditions comme des catalyseurs de réactions (165)

b) les colonnes de chlorure d'argent ne modifient la nature des substances qui leur sont confiées, mais du point de vue technique, leur préparation est plus délicate. En effet, étant donné la nature amorphe du précipité, sa répartition dans la colonne doit être très soigneuse, afin d'éviter la formation de micro-canaux le long des parois, ou au sein de la masse laissant passage au liquide qui, dans ces conditions ne serait plus soumis à la désioduration.

c) les dextrans représentent, très certainement, une possibilité d'avenir importante. En effet, tout d'abord, de part leur nature, ce ne sont

pas des substances aussi agressives que les résines. Par ailleurs, ils présentent des possibilités d'adsorption équivalentes mais surtout, ils sont capables puisque basés sur le double principe d'adsorption-filtration, d'opérer une sélection dans l'échelle des poids moléculaires. Comme pour les résines (166), il existe une série de "cross-linkage" élevé ne laissant pas pénétrer dans les mailles les grosses molécules qui sont rapidement éliminées par simple filtration, alors que les molécules plus petites (ceci dans une limite assez précise) pénètrent dans le dextran lui-même -(Tableau IV), et peuvent être fractionnés par les méthodes chromatographiques habituelles. C'est ainsi que suivant la maille du dextran, on peut exclure, fractionner protéines, peptides, acides aminés etc... De nombreux auteurs, malgré la nouveauté du procédé, les ont déjà utilisés (167-168-169-170) pour notre part, nous avons pu effectuer des séparations très acceptables de peptides, d'ailleurs, c'est le seul procédé qui nous a permis de préciser de façon approximative le poids moléculaire de substances isolées lors de nos expériences .

En conclusion, il est intéressant de signaler combien pour ces problèmes particuliers, les possibilités ont augmenté depuis 10 ans environ : tout d'abord, simple chromatographie sur colonne (amidon, Kieselgühr, cellulose); ensuite, les résines échangeuses d'ions combinant chromatographie et échange ; enfin, dextrans qui permettent actuellement la chromatographie sur colonne, avec exclusion d'ions et détermination approchée des poids moléculaires.

Selon, les circonstances, nous avons utilisé une des technique décrites. Les résultats que nous rapportons ne sont pas très différents les uns des autres, et nous ont permis d'aborder le problème des peptides iodées plasmatiques dans d'assez bonnes conditions.

B - Techniques expérimentales

Nous avons utilisé des rats blancs, souche Wistar, soumis à un

MOYENNE de 20 animaux par série	EXTRACTION SANS DESIODURATION PREALABLE Rf obtenus en PARTRIDGE biphasique				
BUTANOL	0,18 - 0,23		0,46	0,76	0,97
ACIDE	0,20		-	-	0,94
BUTANOL ACIDE	0,18 - 0,23	0,22 - 0,29	0,45	0,78	0,97
+					
BUTANOL AMMONIACAL	0,20	0,25	0,50	-	0,95

TABLEAU III

TYPE	POIDS MOLÉCULAIRE exclus des mailles	TAILLE des grains (microns)
SEPHADEX G 25 - Fine	> 5000	20 - 80
- Grosse		100 - 300
SEPHADEX G 50 - Fine	> 10 000	20 - 80
- Grosse		100 - 300
SEPHADEX G 75	> 50000	40 - 120
SEPHADEX G 100	> 100000	40 - 120
SEPHADEX G 200	> 200000	40 - 120

TABLEAU IV

régime synthétique (température 20° environ). Le prélèvement du sang a été fait moins de 3 heures après l'injection de I^{131} ; la dose d'indicateur nucléaire administrée a été de l'ordre de 50 à 100 µc par rat, étant donné que le sacrifice de l'animal est effectué moins de trois heures après l'injection, l'irradiation au niveau de la thyroïde n'est pas suffisante pour provoquer une modification des processus physiologiques au niveau du plasma. Pour obtenir des quantités de plasma suffisantes, nous avons fréquemment réuni le sang de 30 rats environ, pour disposer, après désioduration d'une radio-activité convenable.

Dans certains cas, une heure avant l'injection d'iode [illegible] ; chaque rat recevait 0,1 unité d'une des hormones "hypothalamiques" dont nous avons vu l'action stimulante sur le phénomène rapide.

Nous donnons ci-dessous, les détails expérimentaux complets concernant des opérations que nous avons réalisées, renvoyant à la section suivante, pour que l'examen des résultats (tableaux et films) puissent être faits d'une façon globale.

1° - Extraction butanolique

Le plasma est d'abord passé sur colonne de CLAg, puis extrait trois fois par le butanol acide (pH1) (le volume étant chaque fois égal à celui de la prise d'essai). Ensuite il est extrait trois nouvelles fois avec du butanol ammoniacal (pH 9-10) dans les mêmes conditions. Enfin on pratique trois extractions aqueuses. La fraction butanol acide est évaporée sous pression réduite jusqu'à volume convenable pour être soumis à la chromatographie selon Partridge. Les fractions alcalines et aqueuses sont réunies, évaporées sous pression réduite et chromatographiées dans les mêmes conditions.

2° - Passage sur DOWEX 1X2

Le passage sur DOWEX 1X2 forme OH^- n'appelle que peu de commentaire. L'élution étant assuré au moyen d'acide acétique (6 ‰, 5 %, 45 et 80 %, chaque éluant contenant 3,75 % de n-butanol). Les différentes

fractions d'élution sont concentrées et chromatographiées dans les conditions identiques.

3° - Passage sur résines DOWEX 50, DOWEX 1

Le volume total du plasma, environ 30 ml, est divisé en fractions de 2 ml qui sont chacune soumise au système DOWEX 50, DOWEX 1. Pour chaque ensemble de colonnes, l'élution est effectuée par 20 ml d'eau distillée qui constituent la fraction 2. Toutes les fractions 2 ,homologues, sont réunies et débarrassées des protéines qu'elles contiennent par précipitation au moyen de l'acide trichloroacétique à 30 %. Le liquide surnageant est alors extrait par l'ether anhydre afin d'éliminer le TCA. L'ether est rejeté car il est inactif.

On notera qu'au cours de cette expérimentation nous nous sommes uniquement intéressés à la fraction 2 puisque c'est dans celle-ci que pouvaient être présents les peptides que nous recherchions, la fraction 1 ne contenant que l'iodure,et la fraction 3, les hormones, libres bu liées et éventuellement des tyrosines. Quant au précipité obtenu par TCA, nous l'avons hydrolysé dans quelques circonstances et obtenu des résultats semblables à ceux que l'on obtient lorsqu'on hydrolyse le plasma total.

4° - Séphadex avec DOWEX 1X2 ou d'AgCL

Pour l'ensemble Sephadex - DOWEX 1, nous avons mélangé une petite quantité de DOWEX 1X2 à la colonne de Sephadex et pratiqué l'élution par l'eau distillée.

Dans ces conditions, les iodures sont exclus de façon formelle. (DOWEX 1X2). Nos premières expériences ont porté sur Sephadex G-100 qui excluent de ses mailles les substances de poids moléculaires supérieurs à 100.000 mais cette technique n'était pas très intéressante du fait de sa sélectivité pour ces hauts poids moléculaires. Pour

revenir dans la zone des peptides, il était alors nécessaire de précipiter l'éluat par TCA. Or, on sait que cet acide précipite toutes les substances protéidiques dont le poids moléculaire est supérieur à 20.000. Dans le surnageant, se trouvait donc des substances dont le poids moléculaire est inférieur à 20.000. Mais par cette méthode on ne tirait profit de l'emploi de Sephadex. Au contraire, avec la Sephadex G-25, il en est tout autrement. Celui-ci laisse couler tout d'abord toutes les substances dont le poids moléculaire est supérieur à 5.000, et l'élution de la colonne fournit une fraction contenant des substances dont le poids moléculaire est inférieur à 5.000. Pour le liquide exclu de la colonne, la précipitation au TCA montre que pratiquement toute la radioactivité se concentre dans le précipité et qu'elle est très faible dans le surnageant ; donc, il existe une fraction protéine iodée de poids moléculaire supérieur à 20 000, nous l'avons hydrolysé..

Quant à la fraction d'élution $0 < PM < 5\,000$ (non précipitable par TCA), elle représente une radioactivité notable.

Comme nous l'avons dit, nous n'avons qu'une expérience très réduite de Sephadex DEAE, dont les possibilités théoriques semblent être intéressantes.

EVAPORATION

Précisons que la concentration des différentes solutions a été faite au moyen d'un évaporateur ERAL rotatif, le récipient d'évaporation tournant dans un bain thermostaté à 30°, le condenseur étant alimenté au moyen d'une micropompe en liquide réfrigérant (propylène glycol à-20°), le vide produit par une pompe à palettes à deux étages.

CHROMATOGRAPHIE

En ce qui concerne la chromatographie, nous avons été au cours de ce travail amenés à utiliser plusieurs solvants :

- n-butanol-acide acétique - eau 80 : 20 : 100
- n-butanol-acide acétique - eau 60 : 15 : 25
- collidine - eau en atmosphère saturée d'ammoniaque
- phénol saturé d'eau en atmosphère saturée d'ammoniaque.
- alcool amylique tertiaire saturé à l'ammoniaque 2N, en atmosphère d'ammoniaque.

Mais étant donné la labilité des substances en expériences, nous avons d'une manière générale préféré le mélange de Partridge : soit monophasique, soit diphasique ; le diphasique nous ayant donné des résultats plus reproductibles. Nous n'avons pas utilisé de manière habituelle des solvants alcalins du type ammoniaque 2N, car ils se révèlent très nocifs, pour les substances iodées. MEYNIEL (78) - LAJUS (171) - BLANQUET (172). Enfin, pour éviter au maximum les désiodations nous n'avons pas recouru à la chromatographie en deux dimensions, malgré les avantages théoriques qu'elle comportait, car le temps de contact avec le solvant est deux fois plus grand que dans le cas de la chromatographie à une dimension.

Le papier chromatographique a toujours été le WHATMANN 1 ou 2, et chaque fois qu'il a été possible, nous avons opéré avec des témoins externes pour étaloner nos résultats.

La détection des chromatogrammes a été effectué chimiquement par immersion dans une solution butalonique de ninhydrine (0,2 %), puis séchage à 85 - 90° C pendant 5 minutes environ. On sait que dans ces conditions les acides aminés ou les peptides apparaissaient en rose-violet, la réaction étant plus longue à se développer pour ces derniers.

La détection de la radioactivité le long du chromatogramme a été faite : soit par autoradiographie, soit par comptage et enregistrement direct au moyen d'un détecteur β (compteur à gaz Tracerlab SC AR), soit par découpage du chromatogramme en bandelettes de 1/2 cm de largeur et comptage dans un cristal puits (Tracerlab AB SC 57 A), l'automatisme étant assuré par un passeur d'échantillons.

Très souvent les trois méthodes ont été utilisé simultanément,

mais il faut préciser que la méthode du compteur puits pour le comptage extemporané est d'une sensibilité très supérieure à celle du compteur β automatique et que de plus, l'autoradiographie a pour avantage de permettre de conserver le document, elle représente la méthode de choix lorsqu'on a affaire à de très faibles radioactivités, puisque la plaque photographique intègre les doses de radiation reçues.

C - RESULTATS EXPERIMENTAUX (Tableaux V - VI)

Le tableau ci-contre montre les résultats chromatographiques des différentes fractions plasmatiques obtenues, soit près extraction désioduration, soit après DOWEX 1X2, soit après traitement DOWEX 50 - DOWEX 1.

Dans tous les cas, on retrouve une bande radioactive de Rf compris entre 0,18 - 0,24, ninhydrine positive. On est pratiquement sûr qu'il n'existe pas d'iodure étant donné les méthodes d'exclusion utilisées, et s'il s'en était formé pendant la chromatographie, on le retrouverait dans le butanol acide où il est soluble. (Or, c'est la seule extraction où on ne constate pas de radioactivité entre 0,18 t 0,24). Par ailleurs on retrouve de façon assez inconstante deux bandes : l'une autour de 0,40 - 0,50, et l'autre autour de 0,60 et 0,70, qui peuvent correspondre à des thyronines en faible quantité, cependant les Rf coïncident de façon très imparfaite. Enfin, on a de manière constante une bande de Rf très élevée 0,88 - 0,95 - dont l'interprétation est très difficile. Elle n'est pas ninhydrine positive, mais migre souvent avec des traces de pigments. Il ne peut s'agir de thyronines marquées dans des temps aussi courts et on peut penser que ce pic est représenté par une petite quantité d'iode minéral, qui a pris naissance pendant la chromatographie et qui se comporte de façon atypique du point de vue migration. Il se trouverait sous une forme oxydée. En effet, les expériences de contrôle que nous avons faites sur les plasmas témoins auxquels on avait ajouté I^{131} nous ont montré de façon constante un pic au fond du solvant après

		Rf obtenus en Partridge biphasique			
rraction après ioduration éalable	BUTANOL		0,50	0,75	0,88
	ACIDE		—	—	0,92
	BUTANOL	0,22	0,40	0,60	—
	Ammoniacal	0,18	—	—	—
tion d'une colonne D 1x2 (OH^-) avec ide acétique 80%		0,20	0,50	0,77	0,95
		0,10	—	—	0,94
action 2 du test uble résine après écipitation TCA		0,18	—	—	—
		0,22	—	—	—

TABLEAU V

	PASSAGE sur COLONNE SEPHADEX Rf obtenus en Partridge biphasique			
ssage sur G100 + DIX2	0,18	0,52	0,69	0,95
précipitation TCA	0,24	0,47	0,64	0,88
ssage sur G25 ou G 50 et	0,24	—	—	0,96
ssage de la 2e partie sur AgCl	0,17	—	0,67	0,82

TABLEAU VI

	TEMOINS EXTERNES			
	IK	MIT	DIT	T_4
olution Aqueuse	0,18	0,40	0,50	0,75
élangé avec plasma et vé acide acétique 80%		0,37	0,50	0,92

extraction acide (Tableau VII).

Il est à remarquer que c'est seulement dans les cas de nos traitements acides (extractions butanol acide ou élution de DOWEX 1X2 par acide acétique) que nous le retrouvons.

Avec le Sephadex les résultats sont pratiquement semblables, nous trouvons les bandes suivantes :

- importante 0,18 - 0,24
- inconstante 0,40 - 0,50 (qui apparaît dans la Sephadex G-100 et n'est plus présente dans la G-25)
- 0,60 - 0,75 comme précédemment,
- et au front du solvant, une bande radioactive ninhydrine négative que nous ne pouvons pas interpréter.

Nos résultats se présentent donc avec une constance assez remarquable quelque soit la méthode d'extraction ou d'isolement suivie. Une bande radioactive très importante entre 0,18 - 0,24, deux bandes très faibles 0,40 - 0,50 - 0,60,- 0,75.

Nous nous sommes essentiellement préoccupés de la nature de cette première bande ninhydrine positive, retenue par la Sephadex G-25, donc de poids moléculaire bas. Sa nature peptidique était très probable et nous avons par conséquent sur cette fraction tenté de réaliser son hydrolyse.

HYDROLYSE

Rejoignant par ce point particulier de nombreux auteurs, nous avons rencontré de très grandes difficultés pour l'hydrolyse des fragments peptidiques éventuels (173). En effet, l'hydrolyse enzymatique ne nous a donné que des résultats peu intéressants et nous avons constaté par exemple, que pepsine, papaine, chymotrypsine entraînaient une désiodation très importante, qui pouvait être mise en évidence par passage sur DOWEX 1X2. Seule, la pancréatine nous a fourni des résultats

	Rf obtenus après une série d'experiences avec $I^{131}K$ (S_3)			
	Butanol Acide		Butanol Ammoniacal	
		+ cystéine		+ cystéine
hromatographie en rtridge monophasique	0,73 + 0,96	0,47 + 0,97	0,21	0,55
hromatographie en rtridge diphasique	0,58	0,24 + 0,55	0,21	0,22 + 0,44
xpériences sur lasma mélangé avec $I^{131}K$	0,98	0,98	0,21	0,74

TABLEAU VII

n doit remarquer que la chromatographie des solutions d'iodure est très omplexe et qu'en dehors du Rf classique, il existe toute une série d'autres Rf lus ou moins constants et en particulier ce Rf au front du solvant qui se ncontre en milieu acide. D'ailleurs d'autres auteurs ont fait les mêmes onstatations que nous, en particulier REVICSKY, SZANTE et FORGACS (175) ar ailleurs PITT-RIVERS (176) d'une part et THRUNNEL (177) d'autre part, constatèrent l'importantes anomalies dans la chromatographie de ces solutions d'iodure.

quelquefois intéressants, la désiodation étant minime, mais malheureusement, ces résultats n ont pas été reproductibles.

En bref, seul Hcl 6N en tubes scellés à l'autoclave à 120° pendant des temps variables nous a fourni des résultats constants.

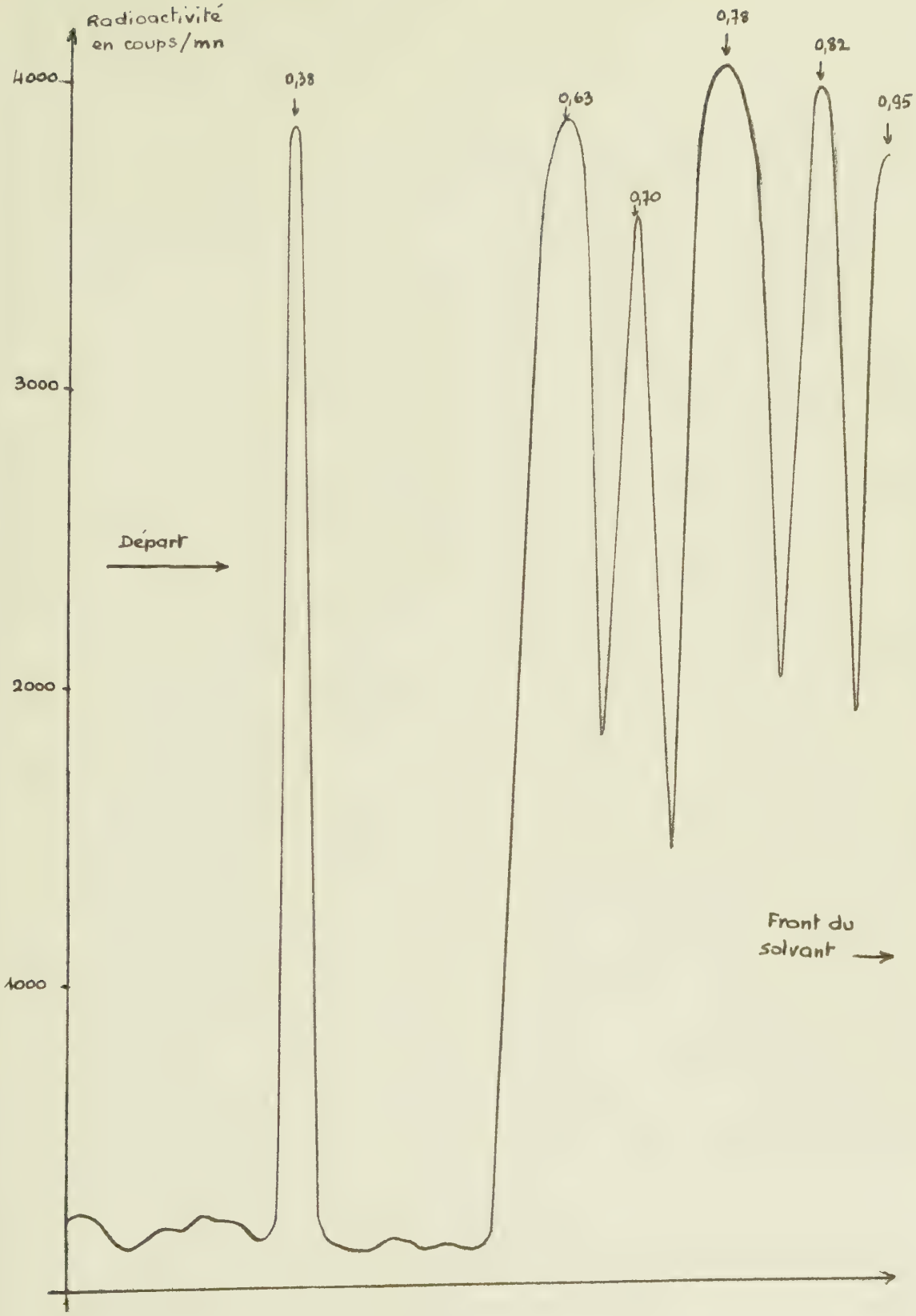
En effet, si on hydrolyse la fraction 0,18 - 0,24 tout d'abord pendant 6 heures, on constate un déplacement de la bande vers les hauts Rf. Pour des temps compris entre 6 et 12 heures, toute la radioactivité s'est concentrée dans la seconde moitié du chromotogramme (Rf > 0,50) en faisant apparaître 3 ou 4 pics dont le Rf le plus bas est supérieur à 0,58.

Si l'on prolonge l'hydrolyse jusqu'à 24 heures, il ne reste plus qu'une bande, d'intensité importante aux alentours de 0,50, accompagnée parfois d'une bande de moindre intensité (Rf 0,35)

Pour des temps compris entre 24 et 30 heures, seule la bande Rf 0,50 subsiste et si l'on pousse beaucoup plus longtemps l'hydrolyse, on finit par assister par une désiodation tout au moins partielle. (Schéma XII)

D - ESSAI D'INTERPRETATION

Il est évident que les phénomènes constatés sont actuellement particulièrement difficiles à interpréter, puisqu'on assiste d'abord à une migration globale de la bande radioactive vers les Rf élevés qui sont, comme on le sait, ceux correspondants aux thyronines. Il n'est pas exclu que dans cette substance complexe de Rf 0,18 - 0,24 l'on ne puisse pas rencontrer des thyronines type T_3 et T_4. Cependant, si l'on admet l'hypothèse d'une chaîne peptidique initiale, de 9 ou 10 maillons par exemple et dont le Rf pourrait se trouver vraisemblablement aux alentours de 0,20, il est difficile de concevoir qu'on puisse trouver après hydrolyse des thyronines dont on sait que les deux noyaux aromatiques sont simplement reliés par un pont oxydique. Il est beaucoup plus logique de penser que des restes "tyrosine iodée" sont reliés les



SCHEMA XII

Schéma obtenu par comptage en spectrométrie δ, d'une chromatographie en Partridge biphasique, obtenue à partir d'un plasma traité par passage sur DOWEX 1X2, SEPHADEX G100, precipité par TCA et hydrolysé à l'autoclave 12.24h par HCl 6N

uns aux autres de la manière biologique habituelle et par conséquent que deux noyaux tyrosine sont réunis par un lien peptidique CO-NH et qu'il en est de même pour tous les autres acides aminés qui constituent le peptide. Ceci ne préjuge en rien sur la place qu'occuperait ces restes tyrosine dans la chaîne. Ils peuvent se trouver soit à l'intérieur de la chaîne elle-même, soit en bout de chaîne.

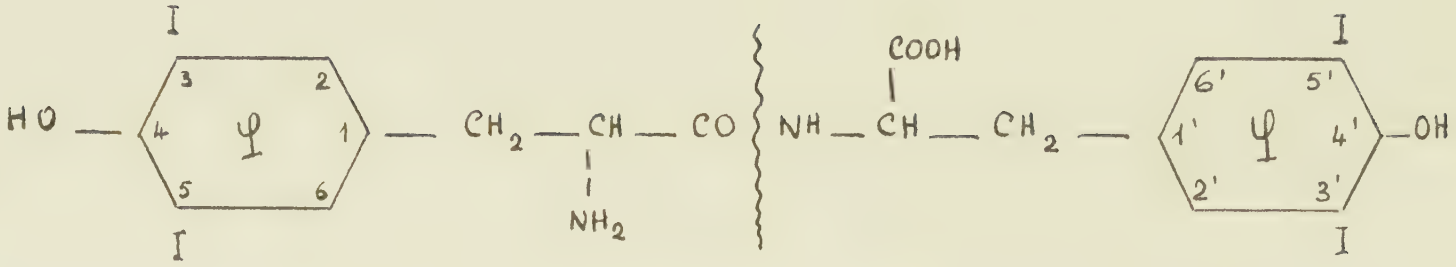
Dans ces conditions, l'hydrolyse acide peu poussée cliverait la chaîne au niveau des restes tyrosine qu'elle isolerait, et une hydrolyse très poussée romprait la dernière liaison peptidique qui existe entre les restes tyrosine, pour les amener à l'état de molécules très simples telles que MIT et DIT.

A vrai dire, il s'agit là purement d'hypothèse, et cependant d'hypothèse logique car si l'on a affaire à un peptide tous les acides aminés constituants sont enchaînés les uns aux autres.par CO-NH, et il n'y a aucune raison pour qu'il n'en soit pas ainsi pour deux molécules de tyrosine contigues iodées à des degrés divers.

C'est ainsi que nous sommes arrivés à penser que dans cette chaîne peptidique pouvaient exister des molécules du type tyrosyl-tyrosine iodée (mono, di, tri ou tétra) (position 3-5 & 3'-5') si ces molécules étaient présentes dans la chaîne, l'hydrolyse complète de la tyrosyl-tyrosine tétraiodée par exemple, devait conduire à 2 molécules de DIT, l'hydrolyse de la triodée devait conduire à 1 molécule de DIT + 1 molécule de MIT selon les formules ci-dessous (Schéma XIII).

C'est bien ce que nous avons constaté en fin d'hydrolyse à l'aide des témoins externes, que les spots 0,35 et 0,50 correspondaient effectivement à MIT et DIT. Il est à remarquer qu'au cours de nos opérations d'hydrolyse, il semblerait qu'il existe une liaison beaucoup plus solide que les autres, celle qui existe entre les 2 tyrosines.

Pour confirmer ce point de vue, c'est-à-dire pour savoir si les tyrosyl-tyrosine étaient vraiment bien présents, nous avons préparé par échange de la TT_4I - TT_3I - TT_2I - TT_1I - et chromatographié l'ensemble. On retrouve un des Rf présents dans l'hydrolysat. Mais cepen-



TYROSYL TYROSINE

Schema XIII

TT_4I (3, 5, 3'5' tyrosyl tyrosine) donne par hydrolyse 2 DIT

TT_3I (3, 5, 3' tyrosyl tyrosine) donne par hydrolyse 1 DIT + 1 MIT

par exemple

dant, on peut penser que la méthode d'échange n'est pas entièrement satisfaisante ; et nous avons pu disposer de substances synthètiques (TT_4I BERGER & MEYNIEL) (174) qui ont été chromatographiées en solvant de Partridge et ont montré un Rf de 0,82 (Schéma XIV).

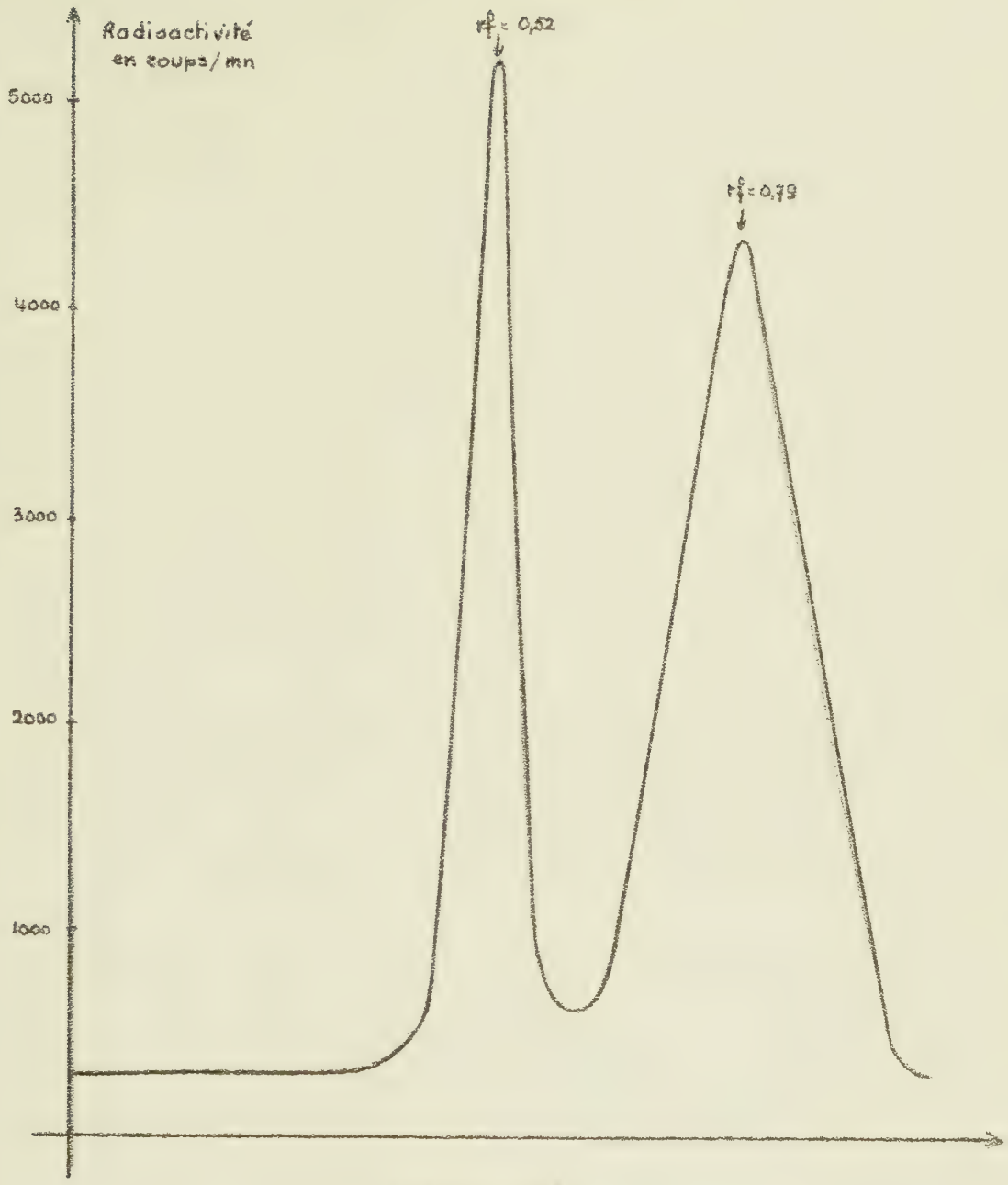
Toutes les conséquences que l'on pourrait tirer de ces faits expérimentaux viennent évidemment à l'esprit, mais ne sauraient être mentionnés ici qu'à titre documentaire.

On peut, en effet, se demander quel est le rôle de la MIT et de la DIT, que paradoxalement on ne retrouve jamais dans le plasma. Sont-elles vraiment des précurseurs de T_4 ou plutôt des métabolites de cette dernière ?

Existe-t-il plusieurs thyroglobulines (LISSITZKY) (62) comme la constatation de peptides iodés dans la thyroïde pourrait le laisser prévoir ?

Enfin et surtout, existe-t-il d'autres substances douées d'activité hormonale, à métabolisme très rapide et circulant dans le plasma ?

C'est pourquoi, dans le dernier chapitre nous avons envisagé l'action biologique de toute une série de composés (en particulier TT_4I) sur la métamorphose du têtard. On sait, en effet, que ce "matériel" est pratiquement spécifique pour l'essai des hormones thyroïdiennes.



SCHEMA XIV

Schéma obtenu par spectrométrie γ d'une chromatographie en Partridge biphasique obtenue à partir de Tyrosyl Tyrosine iodée par ^{131}INa

CHAPITRE IV

EVOLUTION POST-EMBRYONNAIRE DU TETARD DE RANA DALMATINA SOUS L'INFLUENCE DE DIVERSES SUBSTANCES A ACTION THYROIDIENNE

Nous avons utilisé pour l'ensemble de nos expériences des pontes de Rana Dalmatina, provenant de pêches effectuées le 10 mars 1964 dans des mares et fossés aux abords des rives de la Dordogne, en amont de Libourne.

A partir des 15 et 16 mars, les éclosions étaient assez abondantes pour nous permettre de réaliser une soixantaine de lots de 10 têtards chacun, dans des cristallisoirs de verre d'une contenance de 2 litres. Chaque lot de 10 têtards évoluait dans 1 litre d'eau de conduite.

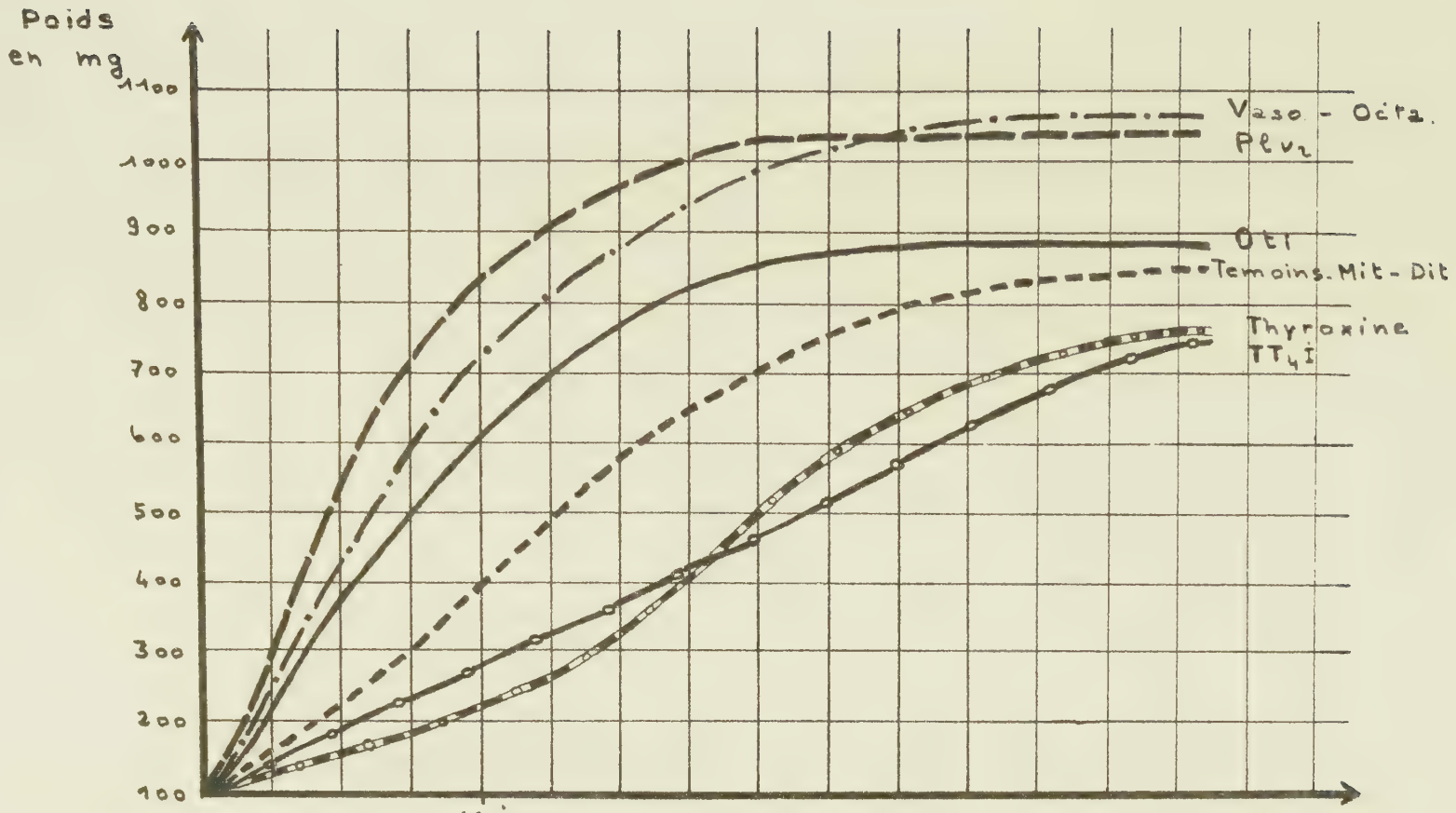
Quarante huit heures après l'éclosion, les **têtards** :sont alimentés avec de la salade cuite longuement, lavée à l'eau, chaque cristallisoir recevant un poids identique de matériel nutritif.

Le 20 mars 1964, le produit à tester est ajouté à la concentration voulue, compte tenu de sa dilution dans le litre d'eau d'élevage. Tous les cinq jours, les cristallisoirs sont vidés, nettoyés et, l'eau, la salade, et le produit à tester renouvelés.

Une fois par semaine, nous avons pesé et mesuré les têtards, à raison de 5 ou 6 par cristallisoir. (schéma 14).

Les bêtes ont été surveillées et observées journellement, et l'apparition des divers stades de la métamorphose soigneusement notée.

Nous avons utilisé comme référence biologique de la chronologie des stades de la métamorphose, le tableau d'évolution post-embryonnaire


Poids
en mg
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
16 jours
durée du
traitement
Vaso - Ocra.
Plv2
Oti
Temoins. Mit - Dit
Thyroxine
TT4I

SCHEMA XV

mis au point et codifié dans le laboratoire du Professeur BOUNHIOL à la Faculté des Sciences de Bordeaux (Schéma 15).

Stade A : pas de bourgeons des pattes postérieures.

B_1 : bourgeons hémiphériques.

B_2 : bourgeons cylindro-coniques courbes

B_3 : Idem, mais avecconstriction tibio-tarsienne (palette terminale)

C : pattes arrières avec ébauche des doigts.

D : genou apparent avec creux poplité distinct.

E : genou débordant le contour de l'animal vu de dos : saillie des membres antérieurs.

F_1 : saillie des pattes antérieures distendant la peau.

F_2 : sortie de l'une des pattes.

F_3 : sortie de l'autre patte.

G : régression caudale.

Si l'on affecte chaque lettre d'un coefficient numérique (A = 1 - B = 2 - B_2 = 3) il est facile de déterminer pour l'ensemble des têtards d'un cristallisoir, un stade moyen d'ensemble.

Des stades A à E : la période est dite prémétamorphose.

Des stades E à F : la période est dite de Pro-métamorphose.

La période F_6 qualifiée de "climax" est caractérisée par l'achèvement de la métamorphose.

L'étude très détaillée des évènements organiques caractéristiques de la métamorphose et survenant entre les stades E et F n'a pu être réalisée.

Nous avons essayé les substances suivantes à la concentration uniforme de 10^{-6} mg / litre (concentration déterminée après essais préliminaires) :

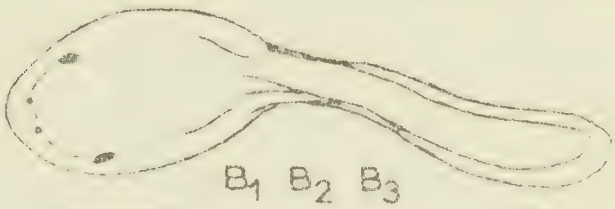
1 - Substances d'origine hypothalamiques (synthétiques, donc pures) (SANDOZ) :

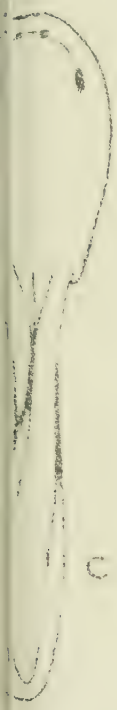
- Vasopressine
- Octapressine
- PLV2
- OTI 98

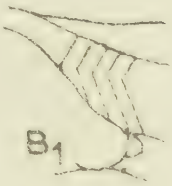
VOLUTION POST EMBRYONNAIRE

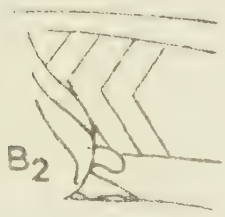
DU TETARD

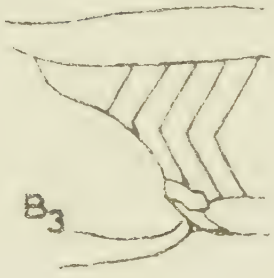
SCHEMA XVI.

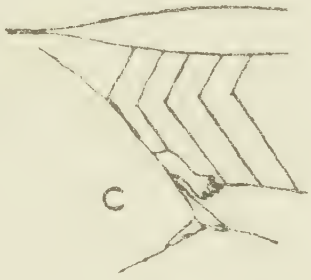


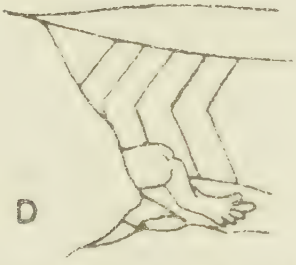












DÉTAIL DE L'ÉVOLUTION DES PATTES POSTÉRIEURES.

ÉVOLUTION DE LA BOUCHE

... antérieur
... ve.

2 - Substances d'origine thyroïdienne (N B C): MIT - DIT - T_4

3 - Tyrosyl-tyrosine tétra iodée par synthèse.

4 - Extrait plasmatique de rats obtenu dans les conditions décrites au chapitre précédent (Séphadex G-25).

RESULTATS EXPERIMENTAUX :

L'ensemble de nos résultats sont résumés dans le tableau 14, ce tableau appelle les commentaires suivants :

A - Dans les quinze premiers jours, on constate :

a) une forte augmentation de poids pour les lots traités à la vasopressine, octapressine, PLV2, OTI 98 (PLV2 présentant le maximum d'augmentation).

b) des poids similaires à ceux des témoins pour les têtards traités à la MIT et à la DIT

c) une diminution de poids par rapport aux témoins des lots traités à la thyroxine et à la tyrosyl-tyrosine tétra iodée.

Les mêmes conclusions sont, d'ailleurs, valables pour la taille de ces têtards. De plus, il y a pratiquement regroupement de tous les lots au stade C.

B - Après 15 - 20 jours de traitement, il y a stagnation des lots PLV2, vasopressine, octapressine, OTI 98 (la vasopressine présentant le maximum de stagnation). Il en est de même pour ceux traités à la MIT et à la DIT. L'évolution post-embryonnaire s'étale, les têtards prennent énormément de poids et sont très fortement pigmentés.

En ce qui concerne les lots traités par la thyroxine, et la tyrosyl-tyrosine tétra iodée, la succession des stades est accélérée et perturbée : les bourgeons des pattes antérieures font proéminence, le museau s'aplatit de façon caractéristique (signe S de BOUNHIOL & DISCLOS), le têtard perd du poids, la nageoire caudale regresse, le membre antérieur

gauche est sorti, alors que les pattes arrières sont encore souvent au stade de l'ébauche des doigts, sans que le genou soit bien différencié.

Dans le cas des têtards traités avec l'extrait plasmatique, on note une accélération intense dans la succession des différents stades. Il est légitime d'utiliser le stade F moyen pour critère ; dans ces conditions, on peut apprécier la vitesse de métamorphose et à titre d'exemple :

- pour une série d'expériences commencées le 22 mars 1964, les témoins atteignent le stade F le 15 mai, les bêtes traitées à la thyroxine le 30 avril. (soit 15 jours plus tôt) Alors que pour l'extrait plasmatique qui n'a été administré qu'à partir du 23 avril, le stade F est atteint le 2 mai.

On voit donc qu'il y a une accélération considérable de la métamorphose puisque ces têtards ont rattrapés environ un mois sur l'évolution de ceux traités à la thyroxine. L'aspect de ces têtards est comparable à ceux qui ont subi l'imprégnation hormonale. Ils sont petits, ont un museau aplati, de gros renflements des membres antérieurs...

Si l'on prend maintenant comme critère le "climax", on constate que pour les témoins, l'élevage n'est pas terminé le 26 mai, et qu'il reste environ un quart des têtards au stade E, alors que pour la thyroxine, la métamorphose est finie pour toutes les bêtes depuis le 15 mai, et par l'extrait plasmatique depuis le 12.

La série de photos, ci-contre, permet d'établir des comparaisons précises et nous pouvons, en conclusion, dire que seule la TT_4I donne des résultats absolument semblables à ceux obtenus avec les thyroxine.. Il est permis de penser que cette substance possède des propriétés hormonales.

Par ailleurs, les substances d'origine hypothalamique ont montré une augmentation de poids seulement dans les stades précoces.

Enfin, l'extrait plasmatique entraîne une accélération considérable de la vitesse de métamorphose. Il semble qu'il y ait sommation de 2 effets : l'accélération précoce comparable à celle des substances hypothalamiques, et l'effet relativement tardif et intense dû à la thyroxine ou à la TT_4I.

Dans ces conditions, il n'est pas interdit d'émettre une hypothèse : les peptides circulants dans le sang contiendraient deux parties : une chaîne assez longue de structure analogue à la vasopressine par exemple, qui serait complétée par de la tyrosyl-tyrosine iodée.

La chaîne longue pourrait fort bien représenter le TRF, et la TT_4I une substance à propriétés hormonales.

PLANCHE 1

En Haut :

- Têtard traité à la thyroxine (au milieu) - allure caractéristique, avec renflement antérieur et museau télescopé.
- Témoin (en haut à droite)
- Photographie prise le 10 mai après 12 jours de traitement.

Au Milieu :

- Têtard traité à la tyrosyl-tyrosine tétra iodée (synthétique) en haut à droite = stade F imminent - morphologie - semblable à celle d'un têtard traité à la thyroxine.
- Témoin (en bas à gauche) stade C^{+}
- Photographie prise le 10 mai après 12 jours de traitement.

En Bas :

- Têtard traité à la thyroxine (en bas à gauche)
- Têtard traité à la tyrosyl tyrosine tétra iodée (à droite)
- Photographie prise le 10 mai après 12 jours de traitement.

- - - - - - - - -

PLANCHE II

En Haut :

- Têtard traité à la MIT (en haut) - stade D - légèrement plus avancé, mais peu de différence avec le témoin.

- Témoin (en bas) - Stade D -

- Photographie prise le 10 mai après 12 jours de traitement.

Au Milieu :

- Têtard traité à la DIT (à droite) - bourgeons des membres "avant" plus nets, stade E - légère avance sur les témoins.

- Témoins (à gauche) stade D -

- Photographie prise le 10 mai, après 12 jours de traitement.

En Bas :

- Têtard traité à la tyrosyl-tyrosine tétra iodée (en haut) - stade F imminent -

- Têtard traité à la thyroxine (en bas) - patte avant gauche sortie, aspect très semblable.

- Photographie prise le 10 mai après 1 mois 20 jours de traitement.

PLANCHE III

En Haut :

- Tétard traité à la tyrosyl tyrosine (non iodée) (en bas).
- Tétard traité à l'OTI 98 (en haut)
  Aspects pratiquement semblables.
- Photographie prise le 10 mai, après 1 mois 20 jours de traitement.

Au Milieu :

- Tétard traité à la tyrosyl tyrosine (non iodée) (en haut) - stade E -
- Tétard traité à la PLV2 (en bas) - très léger retard sur le précédent.
- Photographie prise le 10 mai après 1 mois 20 jours de traitement.

En Bas :

- Tétard traité à la tyrosyl tyrosine (non iodée) (en haut) - Stade E -
- Tétard traité à l'octapressine (en bas) - stade E - aspect très peu différent.
- Photographie prise le 10 mai après 1 mois 20 jours de traitement.

- - - - - - - -

PLANCHE IV

En Haut :

- Têtard traité à la tyrosyl tyrosine (non iodée) (en haut) - stade E - en avance -
- Témoin (en bas) - stade D -
- Photographie prise le 10 mai après 1 mois 20 jours de traitement.

En Bas :

- Têtard traité à la thyroxine (en haut) - stade E -
- Témoin (en bas) - stade C -
- Photographie prise le 10 mai après 1 mois 20 jours de traitement.

C O N C L U S I O N

1° Nous avons tout d'abord rappelé les principales étapes de nos connaissances concernant le métabolisme thyroïdien, en particulier l'accent a été mis sur les travaux fondamentaux d'HARINGTON et coll. d'une part, et d'autre part sur les acquisitions récentes qui ont porté essentiellement sur la biochimie thyroïdienne grâce aux isotopes radioactifs.

2° La thyroïde fait partie d'un large complexe endocrinien. Nous avons envisagé le mécanisme de son contrôle, en nous intéressant, certes, à l'hypophyse, mais aussi à l'hypothalamus dont le rôle prépondérant a été démontré ces dernières années de façon indiscutable grâce à la technique des greffes.

3° Notre attention a été attirée par l'existence de certaines discordances notamment dans les faits expérimentaux. Nous avons donc été amenés à rechercher s'il n'existait pas d'autres substances iodées soit dans la thyroïde, soit dans le plasma, autres que celles connues actuellement et qui permettraient d'expliquer ces anomalies.

4° Nous avons pu d'abord mettre en évidence expérimentalement l'existence au niveau du plasma d'un phénomène rapide correspondant à secrétion organique iodée très précoce et transitoire. Ultérieurement au même stade nous avons pu isoler dans la thyroïde elle-même des peptides iodées dont les Rf correspondaient globalement à ceux des substances qu'avaient isolées LISSITZKY à des stades tardifs après l'injection d'I^{131}.

5° Nous avons recherché au niveau du plasma s'il existait des substances analogues et utilisant des méthodes extractives variées, nous

avons pu constater dans tous les cas, l'existence d'une bande radioactive intense à un Rf compris entre 0,18 - 0,24. Il nous a été possible de montrer qu'il ne s'agissait pas d'iodure, car nous avons utilisé des méthodes de désiodations très puissantes et sélectives. Le voisinage de ce Rf avec celui de l'iodure explique que l'on n'ait pas constaté la présence de ces substances plus précocément.

6° L'hydrolyse de la substance X plasmatique a été réalisée au moyen de l'Hcl 6N pendant les temps variables et nous a conduit vraisemblablement à la tyrosyl-tyrosine tétra iodée de façon transitoire et à la DIT comme terme ultime.

7° Il existe donc en conséquence dans la thyroïde comme dans le plasma un autre "pool" iodé dont nous avons tenté d'étudier le rôle physiologique. A cet effet, des expériences sur la vitesse de métamorphose du têtard ont été effectuées et ont permis de mettre en évidence pour la tyrosyl-tyrosine tétra iodée une action biologique comparable à celle de la thyroxine et pour un extrait plasmatique naturel, une action supérieure.

B I B L I O G R A P H I E

1 - BAUMANN (E) - 1895 - Z. Physiol. Chem. 21 319

2 - BAUMANN (E) - 1896 - Münch. Med. Wschr. 43 309

3 - BAUMANN (E) & ROOS (E) - 1895 - Z. Physiol. Chem. 21 481

4 - OSWALD (A) - 1899 - Z. Physiol. Chem. - 27 14

5 - KENDALL (E.C) - 1915 - J. Biol. Chem. - 20 501

6 - KENDALL (E.C) - 1915 - J.Amer. Med. Assoc. - 64 2042

7 - KENDALL (E.C) - 1915 - Trans. Assoc. Am. Phys. - 30 420

8 - MARINE (D) & ROGOFF (J.M) - 1916 - J. Pharm. Exp. Thérap. - 81 431

9 - GUTMAN (A.B), BENEDICT (E.M), BAXTER (B) & PALMER (W.W) - 1932 - J. Biol. Chem. - 97 303

10- LEBLOND (C.P) & SUE (P) - 1940 - C.R. Soc. Biol. - 133 543

11- LUNDE (G) & WULFERT (K) - 1930 - Endokrinol. - 7 327

12- TATUM (AL) -1920 - J. Biol. Chem. - 45 47

13- HARINGTON (C.R) - 1926 - Biochem. J.- 20 300

14- HARINGTON (C.R) & BARGER (G) - 1927 - Biochem. J. - 21 169

15- HARINGTON (C.R) & RANDALL (S.S) - 1929 - Biochem. J. - 23 373

16- FOSTER (G.L) - 1929 - J. Biol. Chem. 83 345

17- BLUM (F) - 1897 - Verhandl. Kong. in Med. - 15 226

18- HUTCHINSON (R) - 1896 - J. Physiol. - 20 474

19- LUDWIG (W) & Von MUTZENBECHER (P) - 1936 - Z. Physiol. Chem. -244 IV

20- LUDWIG (W) & Von MUTZENBECHER (P) -1939 - Z. Physiol. Chem. 258 195 & 261 253

21- CURIE (I) & JOLIOT (F) -1934 - C.R. Acad. Sci. 198 254

22 - HERTZ (S.A.), ROBERTS (H.) & EVANS (R.D.) - 1938 - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. - 38, 5IO.

23 - HAMILTON (J.G.) & SOLEY (M.H.) - 1939 - Am. J. Physiol. - 127,557.

24 - JOLIOT (F.), BOVET (D.), COURRIER (R.), HOREAU (A.), POUMEAU-DELILE (G.) & SUE (P.) - 1945- C.R. Soc. Biol. - 139, 278.

25 - JOLIOT (F.), COURRIER (R.), SUE (P.) & HOREAU (A.) - 1945 - C.R. Soc. Biol. - 139, 657.

26 - MANN (W.), LEBLOND (C.P.) & WARREN (S.L.) - 1942 - J. Biol. Chem. - 142,905.

27 - LEIN (A.) - 1941 - Endocrinol. - 29, 905.

28 - LEIN (A.) - 1943 - Endocrinol. - 32, 429.

29 - LEBLOND (C.P.) & FINDLAY (D.) - 1948 - Am. J. Roentgenol. Radium Therapy - 59, 387.

30 - LACASSAGNE (A.) & LATES (J.) - 1924 - C.R. Acad. Sci. - 178, 488.

31 - BELANGER (L.F.) & LEBLOND (C.P.) - 1946 - Endocrinol. - 39, 8.

32 - HAMILTON (J.G.), SOLEY (M.H.) & EICHORN (K.B.) - 1940 - Uni. Calif. Publ. Pharmacol. - 1, 338

33 - HEVESY (G.) & HOFER (S.) - 1934 - Nature - 134, 879.

34 - FINK (R.M.),DENT (C.E.) & FINK (K.) - 1947 - Nature - 160, 801.

35 - FINK (R.M.) & FINK (K.) - 1948 - Science - 108, 358.

36 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), JOUAN (P.) & WOLF (W.) - 1955 - Bull. Soc. Chim. Biol. - 37, 819.

37 - ROCHE (J.), LISSITZKY (S.) & MICHEL (R.) - 1952 - C.R. Acad. Sci. - 234, 997 & 2047

38 - GROSS (J.) & PITT-RIVERS (R.) - 1952 - Lancet - I., 439

39 - ROCHE (J.), LISSITZKY (S.) & MICHEL (R.) - 1953 - Biochim. Biophys. Acta 11, 220.

40 - GROSS (J.) & PITT-RIVERS (R.) - 1953 - Biochem. J. - 53, 645.

41 - de VISSCHER (M.) & BECKERS (C.) - 1957 - J. Physiol. - 49, 1055.

42 - KRAYER (O.) - 1928 - Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. - 128, 116.

43 - GROSS (J.) & LEBLOND (C.P.) - 1947 - J. Biol. Chem. - 171,- 309.

44 - KENDALL (E.C.) - 1919 - Endocrinol. - 3, 156.

45 - TAUROG (A.),BRIGGS (F.N.) & CHAIKOFF (I.L.) - 1951 - J. Biol. Chem. 191, 29.

46 - TAUROG (A.), BRIGGS (F.N.) & CHAIKOFF (I.L.) - 1952 - J. Biol. Chem. 194, 655.

47 - BRIGGS (F.N.), BRAUER (R.W.), TAUROG (A.) & CHAIKOFF (I.L.) - 1953 - Amer. J. Physiol. 172, 561.

48 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), ETLING (N.) & JOUAN (P.) - 1956 - C.R. Soc. Biol. - 150, 1320.

49 - MICHEL (R.) & ETLING (N.) - 1957 - C.R. Soc. Biol. - 151, 36.

50 - VANOTTI (A.) - 1957 - Ciba Found. Colloq. on Endocrinol. - 10, 215.

51 - FLOCK (E.V.), BOLLMANN (J.L.), GRINDLAY (J.H) & ORVIS (A.) - 1956 - Amer. J. Physiol. - 187, 407.

52 - THIBAULT (O.) - 1957 - Ciba Found. Colloq. on Endocrinol. - 10, 230.

53 - HARINGTON (C.R.) & PITT-RIVERS (R.) - 1952 - Biochem. J. 50, 438.

54 - PITT-RIVERS (R.) - 1953 - Lancet - 1, 234.

55 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), JOUAN (P.) & WOLF (W.) - 1956 - Endocrinol. 59, 425.

56 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), JOUAN(P.) & WOLF (W.) - 1955 - C.R. Acad. Sci. 241, 1880.

57 - BARKER (S.B.) & LEWIS (W.J.) - 1956 - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 91, 650.

58 - DICKENS (J.G.) & SALMONY (D.) - 1956 - Biochem. J. - 64, 645.

59 - WISWELL (J.G.) & ASPER (S.P.) 1958 - John's Hopk. Hosp. Bull. 102, 115.

60 - ROCHE (J.), MICHEL (O.), MICHEL (R.) & TATA (J.) - 1954 - Radio-isotopes conf. 1, 325.

61 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), MICHEL (O.) & ETLING (N.) - 1957 - C.R. Acad. Sci. - 245, 1089.

62 - LISSITZKY (S.) - 1964 - Exp. Ann. Bioch. Med. 25° serie - Masson Ed°P 1

63 - ROCHE (J.) - 1964 - EXP. Ann. Bioch. Med. 25° serie Masson Ed° P 241.

64 - LISSITZKY (S.) - 1960 - Bull. Soc. Biol. 42, 1187.

65 - LISSITZKY (S.), ROQUES (M.) & BENEVENT (M.T.) - 1961 - Bull. Soc. Biol. 43, 727.

66 - LISSITZKY (S.), ROQUES (M.) & BENEVENT (M.T.) - 1961 - Bull. Soc. Biol. 43, 743.

67 - TATA (J.R.) - 1959 - Biochem. - 2, 215.

68 - TATA (J.R.) - 1958 - Biochim. Biophys. Acta - 28, 91.

69 - LISSITZKY (S.) - 1957 - Ciba Found. Colloq. on Endocrinol. - 10, 181.

70 - ROSENBERG (I.N.) - 1951 - J. Clin. Endocrinol. - 11, 1063.

71 - GRONKVIST (K.E.) & HELLBERG (H.) - 1951 - Farmacetisk Revy - 50, 189.

72 - GROSS (J.) & PITT-RIVERS (R.) - 1952 - Lancet - 1, 439.

73 - DOBYNS (B.M.) & BARRY (S.R.) - 1953 - J. Biol. Chem. 204, 517.

74 - BRAASCH (J.W.), FLOCH (E.V.) & ALBERT (A.) - 1954 - Endocrinol. 55, 768.

75 - STEIN (W.H.) & MOORE (S.) - 1948 - J. Biol. Chem. - 176, 337.

76 - BLANQUET (P.), DUNN (R.W.) & TOBIAS (C.A.) - 1955 - Arch. Biophys. Biochim USA - 58, 502.

77 - BLANQUET (P.), MEYNIEL (G.), MOUNIER (J.) & TOBIAS (C.A.) - 1957 - Bull. Soc. Chim. Biol. - 39, 419.

78 - MEYNIEL (G.) - 1958 - Thèse Doctorat Sciences - Drouillard Ed° - BORDEAUX.

79 - MEYNIEL (G.), BLANQUET (P.), MOUNIER (J.) & ESTIBOTTE (M.) - Bull. Soc. chim. Biol. - 40, 369. 1958

80 - MEYNIEL (G.), BLANQUET (P.), MOUNIER (J.) & ESTIBOTTE (M.) - 1958 - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux - 97, 16.

81 - SCOTT (K.G.) & REILLY (W.A.) - 1954 - Métabolism - 3, 506

82 - GALTON (V.A) & PITT-RIVERS (R.) - 1958 - Biochem. J. - 72, 310

83 - TAUROG (A.) & CHAIKOFF (I.L.) - 1948 - J. Biol. Chem. - 176, 639.

84 - ROCHE (J.), LISSITZKY (S.) & MICHEL (R.) - 1952 - C.R. Acad. Sci. 234, 1228.

85 - GROSS (J.), LEBLOND (C.P.), FRANKLIN (A.E.) & QUASTEL (J.H.) - 1950 - Science - 111, 605.

86 - BLANQUET (P.), MEYNIEL (G.) & SAVOIE (J.C.)- 1960 - C.R. Acad. Sci. 250, 217.

87 - COMAR (D.), BLANQUET (P.), RIVIERE (R.) & KELLERSHOHN (C.) - 1963 - Ann. Fac. Sci. Clermont-Ferrand Tome 5 n° 14 Physique 7° fascicule P.23.

88 - TAUROG (A.) & CHAIKOFF (I.L) - 1947 - J. Biol. Chem. - 171, 439.

89 - CHANEY (A.L.) - 1940 - Industr. Engn. Chim. Anal. - 12, 179.

90 - BARKER (S.B.), HUMPHREY (M.J.) & SOLEY (M.H.) - 1951 - J. Clin. Invest. 30, 55.

91 - GREER (M.A.) - 1951 - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 77, 603.

92 - GREER (M.A.) - 1952 - J. Clin. Endocrinol & Métabol. - 12, 1259.

93 - GREER (M.A.) - 1955 - Endocrinol. - 57, 755.

94 - GREER (M.A.) - 1959 - Endocrinol. - 64, 724.

95 - GREER (M.A.) & ERWIN (H.L.) - 1954 - J. Clin. Invest. - 33, 938.

96 - BOGDANOVE (E.M.) & HALMI (N.S.) - 1953 - Endocrinol. - 53, 274.

97 - BOGDANOVE (E.M.), SPIRTOS (B.N.) & HALMI (N.S.) - 1955 - Endocrinol. 57, 302.

98 - GANONG (W.F.) - FREDERICKSON (D.S.) & HUME (D.M.) - 1955 - Endocrinol. 57,- 355.

99 - FLORSHEIM (W.H.) - 1958 - Endocrinol . - 62, 783.

100- HARRIS (G.W.) - 1950 - J. Physiol. Londres - 111, 347.

101 - BROWN-GRANT (K.), HARRIS(G.W.) & REICHLIN (S.) - 1957 - J. Physiol. Londres - 136, 364.

102 - HARRIS (G.W.) & WOODS (J. W.) - 1957 - Ciba Found. Colloq on Endocrinol. 10, 3.

103 - BROWN-GRANT (K.) - 1957 - Ciba Found. Colloq. on Endocrinol. - 10, 97.

104 - BROWN-GRANT (K.), Von EULER (C.), HARRIS (G.W.) & REICHLIN (S.) - 1954 J. Physiol. Londres 126, 1.

105 - HARRIS (G.W.) - 1955 - "Neural Control of Pituitary gland" Arnold Publ. Londres.

106 - HARRIS (G.W.) - 1956 - in "Hypothalamic Hypophysial Inter-Relatioships" by FIELDS (W.S.), GUILLEMIN (R.) & CARTON (C.A.) - Thomas Publ. Springfield - p. 31.

107 - HARRIS (G.W.) - 1959 - in "Comparative Endocrinology" by GORBMAN (A.) (J.) WHILEY & Sons Publ. New-York - p. 202.

108 - BLANQUET (P.) & TOBIAS (C.A.) - 1958 - Clin. Research - 6, 52.

109 - TOBIAS (C.A.) & BLANQUET (P.) - 1958 - Meeting of the Amer. Federat. for Clinical Research Carmel - Californie.

110 - YAMADA (T.) - 1961 - Endocrinol. - 69, 706.

111 - SCHWEIZER (M.), CHARIPER (H.A.) & HATERIUS (H.O.) - 1937 - Endocrinol. 21, 30.

112 - GREER (M.A.) SCOW (R.O.) & GROBSTEIN (C.) - 1953 - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 82, 28.

113 - Von EULER (C.) & HOLMGREN (B.) - 1956 - J. Physiol. Londres - 131, 125.

114 - GARDNER (W.) & HILL (R.T.) - 1935 - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 32, 1382

115 - ARON (M.); PETROVIC (A.), WEILL (C.) & DEMINATTI (M.) - 1953 - C.R. Acad. Sci. 237, 753.

116 - REBEL (A.) & MARESCAUX (J.) - 1961 - C.R. Soc. Biol. - 155, 2032.

117 - STUTINSKY (F.S.) - 1957 - Arch.Anat. Micros. et Morph l. Exper.- 46, 93.

118 - COURRIER (R.) & COLONGE (R.A.) - 1957 - C.R. Acad. Sci. - 245, 388.

119 - MEUNIER (J.M.) - 1961 - Thèse Doctorat Sciences Bordeaux.

120 - BLANQUET (P.), MEUNIER (J.M.), CROIZET (M.), MAYER (G.) & MEYNIEL (G.) -1961- J. Med. Bordeaux - 8, 979

121 - BLANQUET (P.), MEUNIER (J.M.), CROIZET (M.), MAYER (G.) & MEYNIEL (G.) -1962- C.R. Soc. Biol. - 155, 756.

122 - CROIZET (M.) - 1963 - Thèse Doctorat Etat en Pharmacie - Bordeaux.

123 - VRIGNAUD (C.) - 1964 - Thèse Doctorat Etat en Pharmacie - Bordeaux.

124 - GUILLEMIN (R.) -1962- J. Physiol. Paris - 55, 7.

125 - SHIBUSHAWA (K.) -1960- Act. Endocrinol. - 34 supp 51, 89.

126 - SHIBUSHAWA (K.), SAITO (S.), NISHI (K.), YAMAMOTO (T.), ABE (C.) & KAWAI (T.) - 1956 - Endocrinol Jap. 3, 151.

127 - SHIBUSHAWA (K.), SAITO (S.), NISHI (K.), YAMAMOTO (T.), ABE (C.) & TOMIZAWA (K.) -1956- Endocrinol. Jap. 3, 116.

128 - SHIBUSHAWA (K.), SAITO (S.), NISHI (K.), YAMAMOTO (T.), ABE (C.) & TOMIZAWA (K.) - 1956 - Endocrinol. Jap. 3, 138.

129 - SHIBUSHAWA (K.), YAMAMOTO (T.), NISHI (K.), ABE (C.) & TOMIE (S.) - 1959 - Endocrinol. Jap. 6, 131.

130 - SHIBUSHAWA (K.), YAMAMOTO (T.), NISHI (K.), ABE (C.) & TOMIE (S.) - 1959 - Endocrinol. Jap. 6, 137.

131 - SHIBUSHAWA (K.), YAMAMOTO (T.), NISHI (K.), ABE (C.) TOMIE (S.) & SHIROTA (K.) - 1959 - Endocrinol. Jap. 6, 149.

132 - BERDE (B.) - 1963 - "Pharmacologie des hormones neuro-hypophysaires et de leurs analogues synthètiques"- Masson Edº Paris.

133 - ROCHE (J.), MICHEL (R.), CLOSON (J.) & MICHEL (O.) - 1958 - Rev. Franç- Etudes Chim. et Biol. - 111, 135.

134 - WERNER (S.C.), BECKER (D.V.) & ROW (V.V.) - 1959 - J. Clin. Endocrinol. Metabol. - 19, 953.

135 - BLANQUET (P.), VRIGNAUD (C.), CROIZET (M.), BRANDRICK (A.) & MEYNIEL G. - 1963 - C.R. Soc. Biol. - 157, 804.

136 - CROIZET (M.), BLANQUET (P.), VRIGNAUD (C.), BRANDRICK (A.)& MEYNIEL (G.) - 1963 - C.R. Soc. Biol. - 157, 1264.

137 - CROIZET (M.), BLANQUET (P.), MEUNIER (J.) & MEYNIEL (G.) - 1963 - C. R. Soc. Biol. - 157, 1580.

138 - RIVIERE (R.), COMAR(D.), BLANQUET (P.) & KELLERSHOHN (C.) - 1963 - Nature 200, 682.

140 - MEYNIEL (G.) & coll. - 1964 - 6° colloque annuel sur les explorations fonctionnelles par les radioisotopes. - Toulouse - 8,9,10 Mai 1964.

141 - BOREL (U;) - 1945 - Acta Med. Scand. 161 - suppl. 1 , 227.

142 - BARTHOLOMEI (G.) & MARCHETTO (G.) - 1955 - Biol. Latina - 8, 1.

143 - CURRI (S.B.) & FEDELI (S.) - 1955 - Bull. Soc. Biol. Ital. Sper. 31 , 255.

144 - OTTAVIANI (G.) & AZZALI (G.) - 1955 - Acta Neurovege . 13, 80.

145 - SPIGOLON (G.) - 1955 - Atti. Soc. Lombardo Sci. Med. & Biol. 10, 1.

146 - BAKKE (J.L.) & LAWRENCE (N.) - 1958 - Clin. Research - 6, 244.

147 - SCHARRER (E.) & SCHARRER (B.) - 1954 - in "Handbuch des mikroskopishen Anatomie des Menschen" Von MOLLENDORF (W.) - Springer Ed° - Berlin - VI - n° 5 - 993.

148 - GREEN (J.D.) & HARRIS (G.W.) - 1947 - J. Endocrinol. - 2, 136.

149 - BENOIT (J.) & ASSENMACHER (I.) - 1955 - J. Physiol. Paris - 47, 427.

150 - DUBREUIL (R.) & MARTINI (L.) - 1956 - XX° Int. Physiol. Cong. Bruxelles p. 257.

151 - OGAWA (E.), ARAI (K.) & SHIBATA (K.) - 1956 - Endocrinol. Jap. 3, 211.

152 - BOTTARI(P.M.) - 1957 - Ciba Found. Colloq. On Endocrinol. - 11, 52.

153 - MERTZ (D.) - 1959 - Z. Klin. Med. - 156, 138.

154 - MERTZ (D.P.) - 1959 - Pfugers Arch. Ges. Physiol. - 270, 56.

155 - MERTZ (D.P.) - 1962 - Acta Endocrinonol. Danemark - 40, 290.

156 - MAEDA (H.) - 1961 - Folia Endocrinol. Jap. 37, 364.

157 - SCHINDLER (W.J.) - 1962 - Proc. Soc. Med. 55, 125.

158 - COVILLAULT (J.C.) - Thèse Pharmacie - 1964 - Bordeaux.

159 - MEYNIEL (G.), BLANQUET (P.), BERGER (J.A.), CROIZET (M.) & GAILLARD (G.) - 1964 - Soc. Chim. Biol. sous presse.

160 - LISSITZKY (S.), GREGOIRE (J.), LIMOZIN (N.) & GREGOIRE (J.) - Biochim. Biophys. Acta 35, 565.

161 - LISSITZKY (S.), GREGOIRE (J.), GREGOIRE (J.) & LIMOZIN (N.) - 1960 - C.R. Acad. Sci. 251, 2794.

162 - LISSITZKY (S.), GREGOIRE (J.), GREGOIRE (J.) & LIMOZIN (N.) - 1961 Gen. Comp. Endocrinol. 1, 519.

163 - WILKINSON (J.H.) 1957 - Ciba Found Colloq. On Endocrinol. 10, 228.

164 - FLETCHER (K.) - 1957 - Biochem. J. - 67, 140.

165 - DOW CHEMICAL COMPAGNY - Midland (Michigan - USA) - Ion Exclusion - Development Pamphlet - 1952.

166 - DOW CHEMICAL COMPAGNY - Midland (Michigan -USA) - Dowex Fine Mesh Résins - Publication - 2, 1954.

167 - PORATH (J.) - 1960 - Biochem. Biophys. Acta - 39 , 193.

168 - GUILLEMIN (R.), YAMAZAKI (E.), JUTISZ (M.) & SAKIZ (E.) - 1962 - C.R. Acad. Sci. 255, 1018.

169 - GELOTTE (B.), FLODIN (P.), & KILLANDER (J.)- 1962 - Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 319.

170 - FLODIN (P.) & KILLANDER (J.) - 1962 - Biochem. Biophys. Acta - 63, 403.

171 - LAJUS (A.) - Thèse Pharmacie- 1962 - Bordeaux.

172 - BLANQUET (P.), MEYNIEL (G.), MOUNIER (J.) & ESTIBOTTE - 1958 - Colloq. sur les radioisotopes - Bordeaux Oct. 58 - Sedes Ed° Paris p. 249.

173 - LEGETT-BAILEY (J.) - 1962 - "Techniques in Protein Chimistry" - Elsevier Ed° - New York p. 117.

174 - BERGER (J.A.) & MEYNIEL (G.) - Communication personnelle.

175 - Von REVICSKY (A.L.) SZANTO (L.) & FORGACS (P.) - 1963 - Aezneimittel. Forsch. - 13, 72.

176 - PITT-RIVERS (R.) & WOLFF (J.) - 1959 - Endocrinol. - 64, 841.

177 - DOCTOR (V.M.) & TRUNNELL (J.B.) - 1959 - Endocrinol - 64, 455.

TABLE des MATIERES

Page.

Introduction. 1

CHAPITRE I - Données Générales sur le Métabolisme Thyroïdien. 3

CHAPITRE II - Contrôle du Métabolisme Thyroïdien. . . . 18

CHAPITRE III - Nouvelles Données Expérimentales. . . . 23

- Thyroïde. 29
- Plasma. 32
A) Exclusion de l'iodure. 33
B) Techniques Expérimentales. 36
C) Résultats Expérimentaux. 41
D) Essai d'Interprétation 42

CHAPITRE IV - Evolution Post-Embryonnaire du Têtard de Rana Dalmatina Sous l'Influence de Diverses Substances à Action Thyroïdienne. 45

CONCLUSION - 50

BIBLIOGRAPHIE 52

Vu :

Le Doyen,

F. TAYEAU.

Vu, bon à imprimer :

Le Président,

F. TAYEAU.

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le 2 juin 1964.

Le Recteur,

J. BABIN.